Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf von Cortisol und seinen Abbauprodukten im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Michael Böttger
aus Dresden

Bonn 1980

Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf von Cortisol und seinen Abbauprodukten im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Michael Böttger
aus Dresden

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. H. Kaulhausen
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. L. Siekmann

Aus der Universitäts-Frauenklinik Bonn
(Direktor: Prof. Dr. med. E. J. Plotz)

Druck: Richard Schwarzbold, 5305 Witterschlick b. Bonn

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung 9

2. Literaturübersicht 11

2.1. Sekretion, Verteilung und Abbauwege des Cortisols während der Schwangerschaft bei der Mutter und beim Feten 11

2.1.1. Allgemeine Vorbemerkungen zum menschlichen Cortisolstoffwechsel 12
2.1.2. Mütterlicher Cortisolstoffwechsel während der Schwangerschaft 15
2.1.3. Austausch des Cortisols und seiner Abbauprodukte über die Plazenta 17
2.1.4. Spezielle Abbauwege des Cortisols beim Feten und Neugeborenen. Herkunft der Fruchtwassersteroide 20
2.1.5. Untersuchungen über die Reaktionsbereitschaft der fetalen Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse 23

2.2. Methodische Probleme bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen in biologischen Materialien. Durchführung einer Qualitätskontrolle 25

2.2.1. Richtigkeit 25
2.2.2. Empfindlichkeit 27
2.2.3. Spezifität 28
2.2.4. Präzision 29

3. Materialien und Methoden 32

3.1. Untersuchungsgut 32

Seite

3.2. Materialien 32

3.2.1. Antiserum 32
3.2.2. Reagenzien 33
3.2.3. Steroide 33
3.2.4. Radioaktive Materialien 34
3.2.5. Reagenzgefäße 34
3.2.6. Apparative Ausrüstung 34

3.3. Herstellung der Gebrauchslösungen 35

3.3.1. Antiserum 35
3.3.2. Cortisol-Standardlösung 35
3.3.3. Radioaktives Cortisol 36
3.3.4. Pufferlösungen 37
3.3.5. Aktivkohle-Lösung 37
3.3.6. Brays-Szintillationsflüssigkeit 37
3.3.7. Lösungen für die Säulenchromatografie 38

3.4. Herstellung der Säulenpackung für die Säulenchromatografie 38

3.5. Ausführung der Analysen 39

3.5.1. Äthanol-Fällung 39
3.5.2. Dichlormethan-Extraktion 39
3.5.3. Säulenchromatografie 39
3.5.4. Enzymatische Hydrolyse 41
3.5.5. Radioimmuntest 41

3.6. Berechnungen 43

4. Ergebnisse 44

4.1. Methodische Untersuchungen 44

4.1.1. Trennung des Antikörper-gebundenen Hormonanteils vom freien Hormon 45
4.1.2. Antikörper-Titerkurve 47

Seite

4.1.3. Antikörper-Inkubationszeiten 50
4.1.4. Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve 52
4.1.5. Vergleich verschiedener Standardlösungen 57
4.1.6. Mehrfache Kontrolle der Dosis-Wirkungs-Kurve innerhalb einer Versuchsserie 57
4.1.7. Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bei unterschiedlichen Antikörper-Titern und unterschiedlicher Gesamtaktivität 60
4.1.8. Kreuzreaktionen des Antikörpers 64

4.2. Ergebnisse der Qualitätskontrolle 68

4.2.1. Dichlormethan-Extraktion und Äthanol-Fällung 68
4.2.1.1. Wiederfindung und Richtigkeit 68
4.2.1.2. Präzision 71
4.2.1.3. Vergleich beider Methoden 73
4.2.2. Säulenchromatografie 74
4.2.3. Enzymatische Hydrolyse mit anschliessender Säulenchromatografie 77

4.3. Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf von Cortisol und seinen Abbauprodukten im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter 79

4.3.1. Anwendung der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung als Trennverfahren 79
4.3.1.1. Ausgewählte Verläufe 79
4.3.1.2. Mittlere Cortisolkonzentrationen im Fruchtwasser in verschiedenen Zeitabschnitten der Spätschwangerschaft 84
4.3.1.3. Varianzanalytischer Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen der verschiedenen Zeitabschnitte 93

Seite

4.3.1.4. Darstellung der Beziehung zwischen der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung 98

4.3.2. Anwendung von fünf unterschiedlichen Trennverfahren 98

4.3.2.1. Mittlere Cortisolkonzentrationen in verschiedenen Zeitabschnitten der Spätschwangerschaft nach Anwendung der fünf Trennverfahren 98

4.3.2.2. Varianzanalytischer Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen der verschiedenen Zeitabschnitte bei fünf Trennmethoden 100

4.3.2.3. Darstellung der Beziehung zwischen den einzelnen Trennmethoden 115

5. Diskussion 123

5.1. Einführung 123

5.2. Besprechung der methodischen Untersuchungen 124

5.2.1. Konstanz der Versuchsbedingungen 124

5.2.2. Vergleichbarkeit der Ergebnisse 125

5.3. Besprechung der Ergebnisse nach Anwendung der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung 127

5.4. Besprechung der Ergebnisse nach Anwendung von fünf Trennmethoden 138

5.5. Folgerungen für den fetalen Cortisolstoffwechsel 142

6. Zusammenfassung 150

7. Literaturverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
B_o	am Nullpunkt der Standardkurve ohne Zusatz von unmarkiertem Hormon gemessene (antikörpergebundene) Aktivität
B	bei einer bestimmten Menge von unmarkiertem, antikörpergebundenem Hormon gemessene Aktivität
CBG	cortisolbindendes Globulin, Transcortin
cpm	counts per minute (Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute)
DHA	Dehydroepiandrosteron
FG	Freiheitsgrade
G	Gesamtaktivität
HCG	Humanes Choriongonadotropin
h	Stunde
L/S-Quotient	Lecithin-Spingomyelin-Quotient
MAQ	mittleres Abweichungsquadrat
min	Minute
n	Anzahl der Versuchspersonen
NNR	Nebennierenrinde
Pat.	Patient
Rh-Inkompatibilität	Rhesus-Inkompatibilität
s	Standardabweichung
SAQ	Summe der Abweichungsquadrate
sec	Sekunde
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
VB	Vertrauensbereich
VK	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546508_0015

1. Einleitung

Nachdem bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen die Cortisolkonzentrationen im Fruchtwasser bestimmt worden sind (1,2,3), wies Murphy in einer Untersuchung über den Konzentrationsverlauf des Cortisols im Fruchtwasser auf die Möglichkeit einer Beziehung zwischen diesem Hormon und der fetalen Lungenreife hin (4). Eine andere Studie derselben Arbeitsgruppe zeigte, daß Kinder mit einer niedrigen Cortisolkonzentration im Nabelschnurblut nach der Geburt häufiger ein Atemnotsyndrom hatten als solche mit einer höheren Konzentration von Cortisol im Nabelschnurblut (5).

Da der Lecithin-Sphingomyelin-Quotient zur Zeit der gebräuchlichste Parameter zur intrauterinen Bestimmung der fetalen Lungenreife ist, wurden bei anderen Versuchsreihen gleichzeitig die Cortisolkonzentration und der L/S-Quotient im Fruchtwasser bestimmt und bezüglich ihrer Aussagekraft verglichen (6-11). Dabei stellten drei Arbeitsgruppen eine gute Korrelation zwischen den jeweiligen Datenpaaren fest (6,7,8), andere Arbeitsgruppen berichteten jedoch über eine schlechte Korrelation (9,11). Fencl et al. stellten fest, daß bei einer Cortisolkonzentration im Fruchtwasser über 60 ng/ml kein Atemnotsyndrom auftrat (6). In einer ähnlichen Untersuchung wies Zuspan nach, daß sich mit einer intravenösen Infusion von Cortisol der L/S-Quotient im Fruchtwasser signifikant erhöhen läßt (12).

Möglicherweise lassen sich die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse bei einem Vergleich zwischen L/S-Quotient und Cortisolkonzentration im Fruchtwasser auf die unterschiedliche Spezifität und Genauigkeit der angewandten Methoden zur Bestimmung des Cortisols zurückführen. So wurden unterschiedliche Extraktionsmittel benutzt, die Proben wurden teilweise mit einer Dünnschichtchromatografie oder einer Säulenchromatografie aufgetrennt, und es wurden bei der abschließenden Analyse entweder eine kompetitive Proteinbindungsmethode oder ein Radioimmuntest angewandt; letzterer hat sich als eine spezifische Methode zur Bestimmung der Plasma-Cortisolkonzentration erwiesen (16-21). Weiterhin wurde bisher in ungenügendem Maße berücksichtigt, daß die Steroide im Fruchtwasser, speziell Cortisol und seine Metaboliten, ein

anderes Konzentrationsmuster als im Serum zeigen, wie bereits frühere Untersuchungen gezeigt haben (22-25). Die eben angesprochenen Fragestellungen wurden in der vorliegenden Untersuchung über den zeitlichen Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter genauer untersucht.

Der Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser folgt mit großer Wahrscheinlichkeit komplizierteren Einflußgrößen als der Konzentrationsverlauf im Blut. Dabei ist die Wechselwirkung dieser Einflußgrößen und ihre Bedeutung für die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser schwerer zu durchschauen als bei dem L/S-Quotienten. Die oben angeführten widersprüchlichen Ergebnisse bei der Beurteilung der klinischen Bedeutung der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser lassen sich möglicherweise außer durch experimentelle Untersuchungen auch durch theoretische Überlegungen zu den Ausscheidungswegen und zu der Herkunft des Cortisols im Fruchtwasser weiter klären. Aus diesem Grund wird zunächst unter Ziffer 2.1. genauer auf die Besonderheiten im Stoffwechsel der Glucocorticoide während der Schwangerschaft eingegangen.

Es ist bereits erwiesen, daß sich die fetale Lungenreife durch die präpartale Gabe von Bethamethasonderivaten und anderen Corticosteroiden beschleunigen und daß sich damit die Häufigkeit des Atemnotsyndroms entscheidend senken läßt (26-28). Neben der Bestimmung des L/S-Quotienten lassen sich möglicherweise durch eine Analyse des Konzentrationsverlaufs und der Kinetik von Cortisol und seinen Metaboliten im Fruchtwasser neue Einblicke in den Prozeß der Lungenreifung gewinnen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde die Cortisolkonzentration in einer größeren Serie von Fruchtwasserproben mit Hilfe von fünf verschiedenen Verfahrenstechniken untersucht, die auf der Kombination von einem spezifischen Radioimmuntest, einer Säulenchromatografie, unterschiedlichen Extraktionsmethoden und einer enzymatischen Hydrolyse beruhten.

2. Literaturübersicht

2.1. Sekretion, Verteilung und Abbauwege des Cortisols während der Schwangerschaft bei der Mutter und beim Feten

Die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser unterliegt Einflüssen, deren Bedeutung und Wechselwirkung zur Zeit unklar und noch nicht genügend erforscht sind. Die wesentlichen bisher untersuchten Einflußgrößen sind die Produktionsrate der fetalen Nebenniere, die Ausscheidung und Metabolisierung über die fetale Leber und Niere, die transplazentare Passage der mütterlichen und fetalen Steroide und die mütterliche Steroidproduktion. Nach Klopper spielen außerdem Volumen und Umsatz des Fruchtwassers sowie unterschiedliche Abbauwege und Abbauraten eine Rolle für die unterschiedlichen Konzentrationsverläufe der verschiedenen Hormone (22).
Zur Beurteilung der Frage nach der physiologischen Bedeutung eines Hormons im Fruchtwasser ist außerdem die Beantwortung der Frage wichtig, ob die Fruchtwasserkonzentration durch einen Regelmechanismus eingestellt wird (22).

Die Untersuchungen über die Abbauwege und die Herkunft des Cortisols im Fruchtwasser sind von den einzelnen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Versuchskonzepten geführt worden. Die bisher durchgeführten Untersuchungen können überblickend gegliedert werden in

- vergleichende Bestimmung der Hormonkonzentration im mütterlichen Blut, Nabelschnurblut, fetalem Blut und Fruchtwasser
- Studien zur Stoffwechselkinetik des Cortisols mit Tracer-Infusionsmethoden
- Untersuchung und quantitative Analyse der zirkulierenden, vorwiegend im fetalen Kreislauf gefundenen Cortisolmetaboliten mit zusätzlichem Vergleich der Hormonkonzentrationen im Fruchtwasser und Neugeborenenurin

- Untersuchungen zur Reaktionsbereitschaft der fetalen Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse.

Die klinische Bedeutung der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser im Vergleich zum L/S-Quotienten hängt davon ab, ob Störungen erfaßt und größenmäßig abgeschätzt werden können und sich so bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen schärfere Aussagen erzielen lassen. Zur Darstellung der Problematik wird zunächst auf die Synthese und die Abbauwege des Cortisols beim Menschen eingegangen.

2.1.1. Allgemeine Vorbemerkungen zum menschlichen Cortisolstoffwechsel

Unter den Glucocorticoiden haben Cortisol und Corticosteron beim Menschen die wichtigste physiologische Bedeutung, wobei Cortisol mengenmäßig vorherrscht. Unter dem Einfluß des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) des Hypophysenvorderlappens werden täglich etwa 10 - 20 mg Cortisol und 3 mg Corticosteron von der Nebennierenrinde abgegeben.

Bei der Biosynthese der Nebennierenrindenhormone kommt es zunächst unter dem Einfluß enzymatischer Reaktionen aus Acetyl-CoA zur Bildung des Kohlenwasserstoffs Squalen. Durch Zyklisierung und Dekarboxylierung entsteht aus dem Squalen Cholesterin. Bei der folgenden enzymatischen Abspaltung der Seitenkette des Cholesterins bildet sich zunächst Δ^5-Pregnenolon, von dem sich schließlich die verschiedenen Nebennierenrindenhormone ableiten. ACTH fördert die Synthese von Cholesterin und beeinflußt offenbar auch die Abspaltung der Seitenkette von Cholesterin, so daß vermehrt Δ^5-Pregnenolon entsteht. Durch Hydroxylierung am C_{17}-Atom von Δ^5-Pregnenolon bildet sich 17α-Hydroxy-Δ^5-Pregnenolon. Über verschiedene Umwandlungsschritte leiten sich davon einerseits Cortisol und andererseits durch Abspaltung der Seitenkette auch Dehydroepiandrosteron (DHA) und 11 ß-Hydroxyandrostendion ab (29). Die Synthese von Cortisol ist auch über Progesteron möglich, wobei dieser Weg - wie später gezeigt - in der fetalen Nebennierenrinde beschritten wird (67).

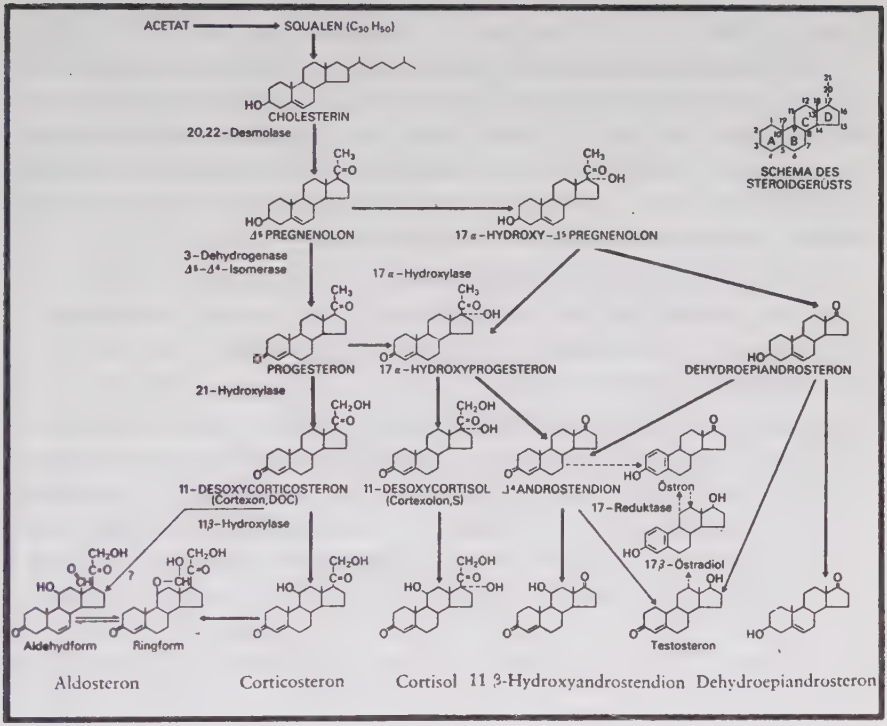


Abb. 1: Schema der Biosynthese der Nebennierenrindensteroide beim Menschen. Nach W. Siegenthaler: Biosynthese der Nebennierenrindensteroide (85).

Die physiologische Halbwertszeit des abgegebenen Cortisols beträgt etwa 90 min. Im Blut ist ungefähr 90% des Cortisols proteingebunden, davon sind 80% an ein spezifisches Protein, das Transcortin (CBG) gebunden. 10% liegen ungebunden in physiologisch aktiver Form vor (30). Unter dem Einfluß enzymatischer Reaktionen, vor allem in der Leber, liegt ein Teil des Cortisols immer auch als Cortison vor. Letzteres kann aber unter geeigneten Bedingungen wieder zu Cortisol reduziert werden (29).

Der Hauptabbauweg läuft über die Leber und den Urin. Beim Gesunden erscheinen 70% des zugeführten radioaktiv markierten Hormons als Urinmetaboliten innerhalb von 24 Std. und über 90% innerhalb von 72 Std. (30).

Im Rahmen des Abbaus entstehen durch Reduktion im Ring A die Tetrahydroderivate von Cortisol und Cortison. Durch Hydrierung am C_{20}-Keton bilden sich die Cortole und Cortolone. Die Tetrahydroderivate sowie die Cortole und Cortolone stellen den größten Anteil der Cortisolmetaboliten dar (ungefähr 80%). Etwa 5-10% von Cortisol und Cortison werden durch Abspaltung der Seitenkette weiter zu 17-Ketosteroiden, nämlich 11-Hydroxyätiocholanolon und -androsteron sowie 11-Ketoandrosteron und -ätiocholanolon abgebaut. Sowohl diese 17-Ketosteroide als auch die Tetrahydrometaboliten sowie die Cortole und Cortolone werden durch Koppelung mit Glucuronsäure am C_3-Hydroxyl wasserlöslich und damit leichter harnfähig gemacht. In geringerem Ausmaß werden sie auch mit Schwefelsäure gekoppelt in konjugierter Form ausgeschieden. Beim gesunden Erwachsenen stellt das 6 ß-Hydroxycortisol ein relativ unbedeutendes Stoffwechselprodukt dar (29). Nur ein geringer Prozentsatz von Cortisol und Cortison wird unverändert ausgeschieden, nämlich ungefähr ein Prozent (30).

Die eben beschriebenen Synthese- und Abbauwege sind grundsätzlich auch während der Schwangerschaft gültig, es ergeben sich jedoch einige quantitative Verschiebungen.

2.1.2. Mütterlicher Cortisolstoffwechsel während der Schwangerschaft

Der Cortisolumsatz ist während der Schwangerschaft signifikant verändert durch den Einfluß von Hormonen, die eine veränderte Synthese- und Abbaurate bewirken, durch den Einfluß der Plazenta und durch den Einfluß der fetalen Nebenniere (30). Vermutlich durch den steigenden Östrogenspiegel kommt es über einen Anstieg des Transcortins zu einem Anstieg des Cortisol-Gesamtgehaltes im mütterlichen Plasma (30,31). Der Tagesrhythmus bleibt jedoch erhalten (30).

Über die Höhe des freien, biologisch aktiven Cortisolanteils liegen verschiedene Beobachtungen vor. Nach Brien et al. steigt das freie Cortisol genau wie das Gesamtcortisol während der Schwangerschaft kontinuierlich an mit einem steileren Konzentrationsanstieg in der 36. Schwangerschaftwoche (32). Auch die Urinausscheidung von Cortisol, die nach allgemeiner Auffassung ein Maß für den freien Anteil des Plasmacortisols ist, steigt während der Schwangerschaft an (32). Die Östrogene scheinen keinen Einfluß auf den freien Hormonanteil zu haben, bzw. sie scheinen ihn sogar zu senken (30, 31, 32). Brien schließt in Übereinstimmung mit den experimentellen Befunden anderer Autoren, daß entweder ein Anstieg des ACTH-Spiegels im mütterlichen Blut oder die Anwesenheit eines Plazenta-Hormons mit corticotroper Wirkung für den Anstieg des freien Cortisols verantwortlich ist (32). Goodyer et al. beschrieben die corticotrope Wirkung von HCG und Prolaktin (33).

Dabei scheint das ACTH in physiologischen Konzentrationen nicht die Plazenta zu überschreiten, so daß die Konzentration als ein bei Mutter und Fet unabhängiges Maß für die Stimulation der NNR angesehen werden kann (31,34,35). Johnstone et al. fanden heraus, daß sich nach maximaler Nebennierenstimulation bei Schwangeren ein stärkerer Anstieg der freien Plasma-Cortisolkonzentration fand als bei nichtschwangeren Kontrollpersonen (36). Auf diese Weise ließe sich erklären, daß unter Stressbedingungen aufgrund eines Überschusses an freiem Hormon, Cortisol über die Plazenta zum Fetus fließt, wie von einigen Autoren postuliert.

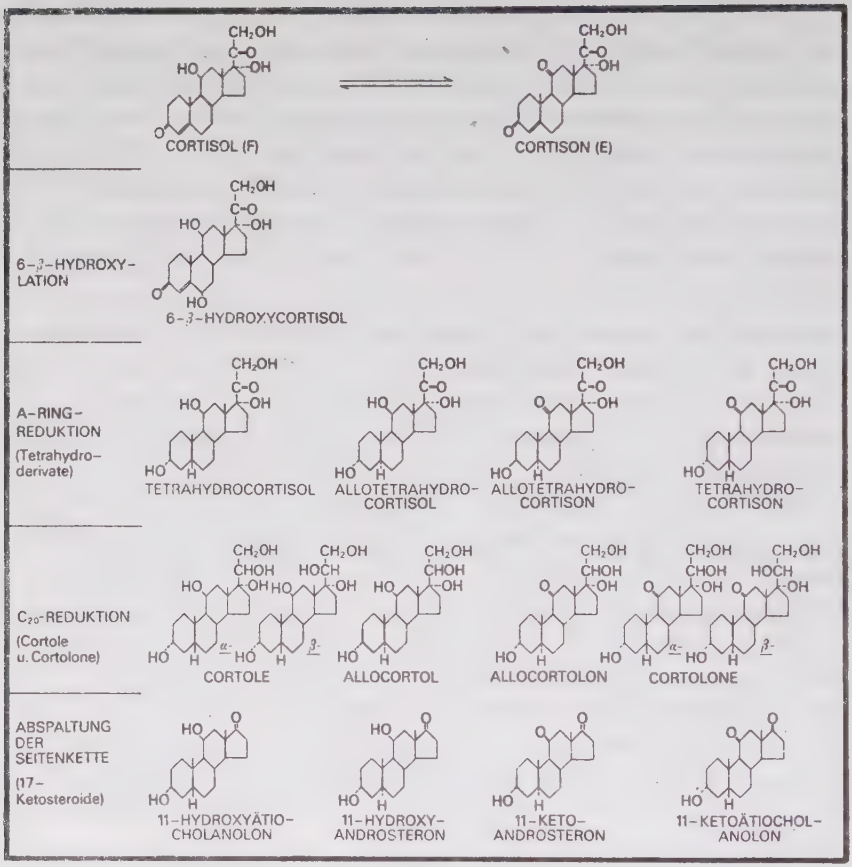


Abb. 2: Die Metaboliten des Cortisols beim Menschen. Nach W. Siegenthaler: Stoffwechsel der Nebennierenrindenhormone (29).

Möglicherweise ist die verringerte Umsatzrate von Cortisol im mütterlichen Plasma außer durch den Anstieg der Proteinbindungsrate auch durch einen Einfluß der Östrogene auf die Leberenzyme bedingt. Unter Östrogeneinfluß scheint die Aktivität der NADPH-abhängigen Δ 4-Reduktase, die den Abbau des Cortisols zum Dihydrocortisol katalysiert, erniedrigt zu sein. Als alternativer Abbauweg wird möglicherweise die 6 ß-Hydroxylation begangen, da das 6 ß-Hydroxycortisol bei Schwangeren vermehrt mit dem Urin ausgeschieden wird (30). Ob dieser Metabolit mütterlicher Herkunft dabei auch die Plazenta passiert und im Fruchtwasser nachweisbar wird, ist fraglich. Wie später gezeigt, scheidet die Mutter während der Schwangerschaft in steigendem Maße Metaboliten der C-21-yl-Sulfat-Reihe aus, die mit großer Wahrscheinlichkeit aus dem fetalen Stoffwechsel stammen.

2.1.3. Austausch des Cortisols und seiner Abbauprodukte über die Plazenta

Die eben genannten Überlegungen sind bedeutsam für den Austausch des Cortisols zwischen Mutter und Feten über die Plazenta (30,31). Nach Oakey hat das Nabelschnurblut eine niedrigere Eiweißbindungsrate für Cortisol als das mütterliche Plasma. Ursache ist entweder ein niedrigerer Transcortingehalt oder die konkurrierende Bindung von Progesteron, das im Nabelschnurblut in hohen Konzentrationen vorliegt. Er folgerte, daß aufgrund der höheren Konzentration von freiem Cortisol ein Nettoeinstrom in das mütterliche Plasma stattfindet (31). Levevbre et al. berichteten, daß sich nach der Injektion einer Einzeldosis Cortisol in das Fruchtwasser ein dreifacher Anstieg der Cortisolkonzentration im mütterlichen Plasma fand (37).

Bei Schwangeren mit Nebennierenrindeninsuffizienz fand sich nach Oakey trotz fehlender Eigenproduktion eine subnormale Cortisolproduktion in der Spätschwangerschaft. Dabei lagen die Sekretionsraten in der gleichen Größenordnung wie beim Neugeborenen (31). Bei Schwangeren mit anencephalen Feten wurde über eine niedrigere Cortisolkonzentration im Fruchtwasser berichtet als bei Frauen mit gesunden Feten (4,38). Myakawa et al. fanden im Nabelschnurmisch-

blut von anencephalen Feten eine signifikant erniedrigte Cortisolkonzentration (39). Fencl et al. bestimmten Cortisol und Cortison in Nabelschnurarterie und -vene, im mütterlichen Venenblut und im Fruchtwasser bei anencephalen Feten. Sie fanden in der Nabelschnurarterie und im Fruchtwasser eine niedrigere Cortisol- und Cortisonkonzentration als bei normalen Feten. Die Cortisol- und Cortisonkonzentration in der Nabelschnurvene und im mütterlichen Venenblut unterschieden sich nicht von denen, die bei normalen Patientinnen bestimmt wurden. Sie folgerten, daß die Corticosteroide in der Nabelschnurvene hauptsächlich von der Mutter stammten und daß das Cortisol im Fruchtwasser aus den fetalen Nebennieren stammte (38).

Möglicherweise lassen sich aus diesen Beobachtungen weitere Schlüsse über den Austausch der Glucocorticoide über die Plazenta und die Herkunft des Cortisols im Fruchtwasser ziehen. Bei der Beurteilung dieser Versuche muß jedoch darauf geachtet werden, daß sich bei diesen Patientinnen mit Nebenniereninsuffizienz bzw. anencephalen Feten aufgrund eines veränderten Konzentrationsgradienten an der Plazenta möglicherweise ein Nettoeinstrom in einer zum normalen Fluß abweichenden Richtung stattfindet.

Überschreitet die Cortisolkonzentration im mütterlichen Blut die Kapazität des Transcortins, wie es möglicherweise unter dem Geburtsstreß oder bei der Gabe hoher Dosen von Glucocorticoiden der Fall ist, so findet möglicherweise ein Nettoeinstrom von der Mutter zum Feten statt (31). Der Einfluß der Geburt auf den Konzentrationsverlauf des Cortisols im mütterlichen Blut und im fetalen Kreislauf wird in verschiedenen Arbeiten diskutiert (30,34,35,40-49).

Zusammengefaßt untersuchten die Autoren die Frage, ob sich der Anstieg der Cortisolkonzentration im fetalen Kreislauf auf einen Anstieg der mütterlichen Cortisolkonzentration zurückführen ließ oder ob eine gesteigerte Glucocorticoidproduktion der fetalen Nebenniere für das Ingangkommen der Geburt verantwortlich ist. Murphy et al., Leong et al. und Nwosu et al. wiesen nach, daß der Anstieg der Cortisolkonzentration im fetalen Kreislauf im Rahmen der Geburt unabhängig vom mütterlichen Cortisolspiegel ist (43-45).

Dagegen folgern Sybulski et al. und Ohrlander et al. aus ihren Untersuchungen, daß der Anstieg des fetalen Cortisolspiegels während der Geburt auf dem Anstieg des Hormons bei der Mutter beruht (40,41,42). Ohrlander et al. folgern in Obereinstimmung mit anderen Autoren, daß die Kapazität der 11 ß-Dehydrogenase in der Plazenta, die einen großen Teil des mütterlichen Cortisols während der Plazentapassage in Cortison umwandelt, durch einen Überschuß der mütterlichen Steroide überlastet wird. Dadurch tritt möglicherweise freies aktives Cortisol in den fetalen Kreislauf über (42).

Die eben angeführten Untersuchungen haben wahrscheinlich auch bei anderen Stressformen ihre Gültigkeit. Dabei gelangen möglicherweise vermehrt Glucocorticoide von der Mutter zum Feten.

Mit der eben beschriebenen Umwandlung von Cortisol zu Cortison während der Plazentapassage setzen sich eine Reihe anderer Untersuchungen auseinander (42,45,52-56). Nach Murphy et al. wurde ein hoher Prozentsatz von zugeführtem radioaktiv markiertem Cortisol nach Plazentapassage im fetalen Kreislauf als Cortison wiedergefunden (52). Dabei muß allerdings beachtet werden, daß nach Giannopoulos die fetalen Lungenzellen die Fähigkeit zur Umwandlung von Cortison zu Cortisol besitzen (13).

In Übereinstimmung mit diesen Befunden stellte Kittinger in einer Tracer-Infusionsstudie bei Primaten folgendes fest: Das Verhältnis der Cortisolkonzentration im Blut der Mutter zur fetalen Cortisolkonzentration beträgt etwa 3:1. Etwa 60% des fetalen Cortisols stammt von der Mutter, wobei sich die Austauschraten an der Plazenta in beiden Richtungen nicht wesentlich unterscheiden. Die Cortisolkonzentration ist im fetalen Blut höher als im mütterlichen. Da ein großer Teil des Nabelschnurblutes zuerst die Leber passiert, trägt die Leber als vorgeschaltetes Filter genau wie die Plazenta zur Metabolisierung des Cortisols zu Cortison, Tetrahydrocortison und Tetrahydrocortisol bei (53).

Eine vergleichbare Untersuchung führten Abramovich et al. durch (57). Sie infundierten bei Schwangeren, bei denen eine Interruptio vorgesehen war, radioaktives Cortisol mit konstanter

Infusionsrate ca. fünf Stunden vor der Operation. Bei der Untersuchung des fetalen Urins, Plasmas und Fruchtwassers fanden sie heraus, daß der Anteil an freiem, markiertem Cortisol im Fruchtwasser deutlich höher war als im fetalen Urin und Plasma. Außerdem unterschied sich die Zusammensetzung der radioaktiv markierten Cortisol-Metaboliten im Fruchtwasser bei dieser Untersuchung deutlich von der sonst gefundenen Zusammensetzung. Sie folgerten, daß in ihrem Versuch nur eine geringe Menge der Fruchtwassersteroide mütterlichen Ursprungs war und daß diese größtenteils zur Mutter zurückgelangten. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Metaboliten im Fruchtwasser und im Urin folgerten sie, daß geringe Mengen an Cortisol unter bestimmten Bedingungen auf anderen Wegen als über die fetale Niere in das Fruchtwasser gelangen, evtl. über die Nabelschnur, die fetale Haut, die Plazenta oder das Amnion und Chorion. Der größte Teil der konjugierten Metaboliten stammt nach Ansicht der Autoren aus der fetalen Niere (57).

2.1.4. Spezielle Abbauwege des Cortisols beim Feten und Neugeborenen. Herkunft der Fruchtwassersteroide

Eine Reihe von Untersuchungen setzt sich mit dem unterschiedlichen Verteilungsmuster der Steroide und ihrer Metaboliten im Nabelschnurblut, mütterlichen Blut, Fruchtwasser und Neugeborenenurin auseinander (23-25,54,56,58-61). Die Untersuchungen stützten sich unter anderem auf die Tatsache, daß sich beim Feten und Neugeborenen nur ein kleiner Teil der Steroidmetaboliten mit den Extraktions- und Hydrolysemethoden wiederfinden ließ, die beim Erwachsenen angewendet wurden (58). Insbesondere ließ sich durch Hydrolyse mit Beta-Glucuronidase beim Neugeborenen nur ein kleiner Prozentsatz an Cortisol-Metaboliten finden, was mit der geringen Aktivität der Glucuronyltransferase in der fetalen Leber in Einklang zu bringen ist. Zur Klärung dieser Differenzen beschäftigten sich mehrere Autoren mit dem möglichen Einfluß von hochpolaren Steroiden, die mit den üblichen Bestimmungsmethoden nicht erfaßt wurden. Unter diesen Metaboliten hat das 6 ß-Hydroxycortisol besonderes Interesse gefunden (10,22,23,31,58,62,63).

Lambert et al. fanden bei einer Untersuchung des Fruchtwassers bei anencephalen Kindern eine erniedrigte Konzentration (23). Klopper führte den Gehalt des Fruchtwassers an diesem Hormon als Beweis für die Aktivität der fetalen Nebenniere und die Ausscheidung über die Niere an (22). Eine Kritik gibt Giroud: er beobachtete, daß sich nach Gabe von radioaktiv markiertem Cortisol im Vergleich zu Tetrahydrocortison nur wenig Aktivität im ausgeschiedenen 6 ß-Hydroxycortisol fand (58). Er folgerte, daß das 6 ß-Hydroxycortisol eher ein Produkt der Nebennierensekretion als ein Metabolit des Cortisols ist (58). Möglicherweise lassen sich auch im Fruchtwasser genau wie im Neugeborenenurin noch weitere hochpolare Cortisolmetaboliten nachweisen, wie beispielsweise das 6 ß-Hydroxy-Tetrahydrocortisol. Die betreffenden Substanzen wurden bereits synthetisiert und stehen für weitere Bestimmungen zur Verfügung (62).

Mit der Rolle der Steroide aus der C-21-yl-Sulfat-Reihe als spezielle Abbauprodukte im Fruchtwasser und Urin beschäftigten sich eine Reihe anderer Arbeiten (24,25,54,56,58,61). Grundlage dieser Untersuchungen war der Nachweis einer Sulfokinase für eine Reihe von C-18, C-19- und C-20-Steroide in der Leber und in der Nebennierenrinde des Fetus (58). In verschiedenen Untersuchungen verglichen Schweitzer et al. die Konzentrationen von einigen sulfatierten Steroiden im mütterlichen Blut, Nabelschnurblut und Fruchtwasser. Sie fanden folgendes heraus: Cortisol war das Hauptsteroid im mütterlichen Blut, Cortison das Hauptsteroid im fetalen Blut. Corticosteronsulfat, 11-Dehydrocorticosteronsulfat, 11-Desoxycorticosteronsulfat und Cortisolsulfat sind im Nabelschnurblut in signifikant höheren Konzentrationen vorhanden als im mütterlichen Blut. Sie folgerten auf die fetale Herkunft bzw. Entstehung dieser Steroide (24,25,54,56). Möglicherweise wird durch die Umwandlung von Cortisol zu Cortison und die Sulfatierung von Corticosteron und 11-Desoxycorticosteron der Fetus vor zu hohen Glucocorticoid- und Mineralocorticoidwirkungen geschützt (58).

Bei einem Vergleich der Tetrahydroderivate und der Sulfate von Cortisol, Cortison und Corticosteron berichteten Schweitzer et al. über folgende Ergebnisse:

Die hohe Konzentration von Cortison und 11-Dehydrocorticosteron spiegelt die Aktivität der 11 ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase in der Plazenta wieder. Die Sulfate von Cortisol und Cortison sind hauptsächlich fetaler Herkunft. Die Steroide im Nabelschnurblut spiegeln hauptsächlich die sekretorischen und metabolischen Prozesse im mütterlichen Blut und in der fetoplazentaren Einheit wieder. Die Steroide im Fruchtwasser geben die Aktivität der fetalen Nebennierenrinde und Niere wieder, was sich auch durch den hohen Anteil der sulfatierten Metaboliten belegen läßt. (24,25,54,56). Genau wie im Neugeborenenurin ist das Tetrahydrocortison der bedeutendste Metabolit, gefolgt von den Sulfaten von Cortisol, Cortison und Corticosteron. Die Konzentrationen von Cortisolsulfat zu Cortisol verhalten sich wie 2.2 : 1, die Konzentrationen von Cortisonsulfat zu Cortison verhalten sich wie 2.5 : 1. Bei der Bestimmung der Hydroxysteroide eines Fruchtwasserpools waren 10% ungebunden, 22% lagen in der Sulfatfraktion vor und 67% in der Glucuronidfraktion (25). Dieses Ausscheidungsmuster ändert sich nach Giroud in den ersten Tagen nach der Geburt nicht wesentlich außer einer Abnahme der Cortisolsulfat-Ausscheidung (58). Ein weiterer Beleg für die fetale Herkunft der sulfatierten Metaboliten ist der Nachweis, daß die Sulfate von Cortisol, Cortison und Corticosteron während der Schwangerschaft in steigendem Maß von der Mutter ausgeschieden werden und daß diese Ausscheidung nach der Geburt abrupt abfällt (58).

Ducharme et al. folgerten aus ihren Untersuchungen zur Bestimmung der Urinausscheidung von Cortisol, Cortison, Tetrahydrocortison, Tetrahydrocortisol, Corticosteron und 6 ß-Hydroxycortisol: Die Sulfatverbindungen machen mehr als 50% der Glucocorticoidausscheidung aus. Durch Streßeinwirkung wie z.B. das Atemnotsyndrom ließ sich jedoch der Anteil der Glucuronide erhöhen. 6 ß-Hydroxycortisol war gleichmäßig auf die Sulfat- und Glucuronidfraktion verteilt. Der größere Anteil von Cortisol wurde als Cortisolsulfat ausgeschieden (59).

Aderjan et al. fanden nach Hydrolyse mit einer spezifischen Sulfatase einen höheren Prozentsatz an Cortisol als nach enzymatischer Aufspaltung mit Glucuronidase (10).

2.1.5. Untersuchungen über die Reaktionsbereitschaft der fetalen Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die Bedeutung der fetalen Cortisolsekretion wurde in verschiedenen Arbeiten untersucht. Sybulski et al. folgerten aufgrund eines im Vergleich zum Nabelschnurblut erhöhten Cortisolspiegels im fetalen Schädelvenenblut auf die Aktivität der fetalen Nebennierenrinde (40). Murphy et al. folgerten aufgrund einer Konzentrationsdifferenz zwischen der Cortisolkonzentration in der Nabelschnurvene mit höherer Konzentration und der Nabelschnurarterie mit niedrigerer Cortisolkonzentration auf eine fetale Eigensynthese von Cortisol. Die obengenannte Differenz ließ sich beim Cortison nicht nachweisen (55). Smith et al. berichteten ebenfalls über eine arteriovenöse Konzentrationsdifferenz von Cortisol im Nabelschnurblut (64). Die gleichen Autoren berichteten über einen starken Anstieg des Cortisols im Nabelschnurblut in der 35. bis 37. Schwangerschaftswoche (64). In Übereinstimmung mit anderen Autoren stellten Arai et al. fest, daß der Fet auf den Geburtsstreß mit einer gesteigerten ACTH-Sekretion reagiert (48). Goodyer et al. und Slavinski et al. berichteten, daß sich durch Zugabe von ACTH zu einer NNR-Zellkultur die Glucocorticoidproduktion signifikant steigern ließ (33,65). Mit den unterschiedlichen Synthesewegen der Glucocorticoide und mit dem Einfluß der Plazenta beschäftigten sich verschiedene Autoren (31,67,68).

Die fetale Nebennierenrinde ist aus zwei Zonen aufgebaut, einer inneren "fetalen" Zone, die bei der Geburt etwa 80% des gesamten Organs einnimmt und einer äußeren Zone (31,68). Das Wachstum beider Zonen steht unter dem Einfluß von ACTH (31).

Die fetale Zone ist imstande, das von der Plazenta stammende Pregnenolon mit Hilfe einer $C_{17,20}$-Desmolase in Dehydroepiandrosteron umzuwandeln (31,67). Im Gegensatz zur "endgültigen" Zone ist sie jedoch nicht in der Lage, aufgrund des Mangels an 3 ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, Pregnenolon für die Cortisol-Synthese auszunützen, wie die Abbildung 3 zeigt (31,67). Zur Cortisol-Synthese ist sie auf das Progesteron angewiesen, welches in der Plazenta aus Acetat und Mevalonat synthetisiert wird (31,67).

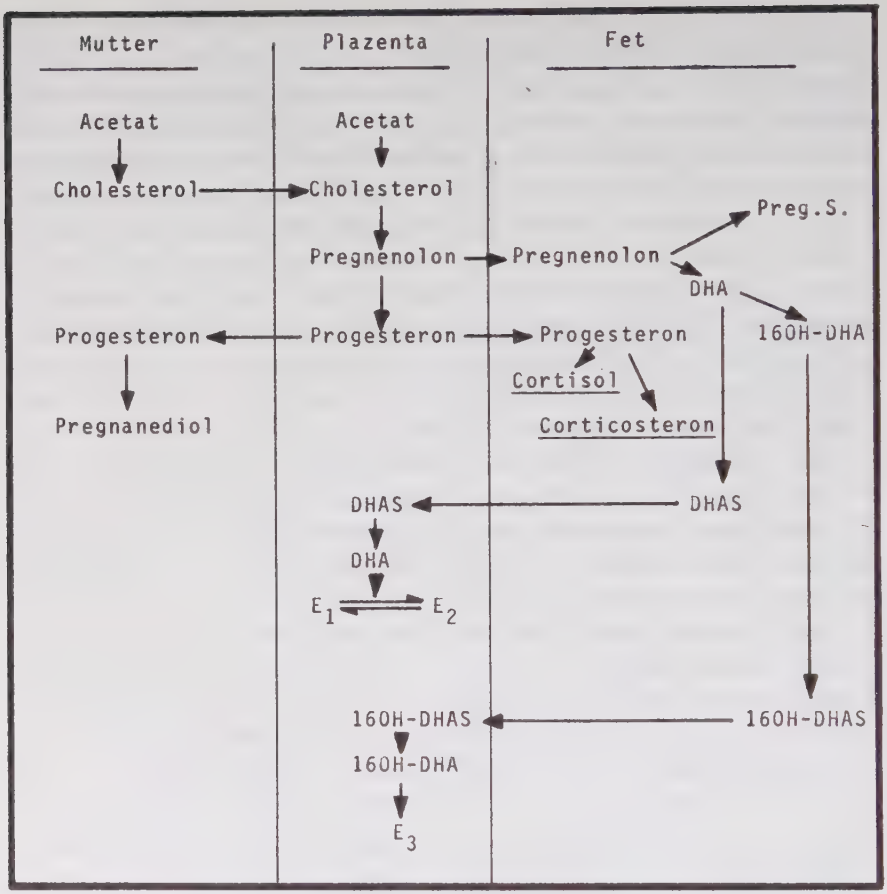


Abb. 3: Schema der Cortisol- und Corticosteron-Biosynthese beim Feten. Die Abkürzungen lauten im einzelnen:
Preg.S. = Pregnenolon-Sulfat, DHA = Dehydroepiandrosteron, 16OH-DHS = 16-Hydroxy-Dehydroepiandrosteron-Sulfat, E_1 = Östron, E_2 = Östradiol, E_3 = Östriol.
Die Abbildung zeigt, daß die "fetale" Zone der NNR auf plazentares Progesteron zur Cortisol-Synthese angewiesen ist. Nach Villee: Placenta and fetal tissues: A biphasic system for the synthesis of steroids (67).

2.2. Methodische Probleme bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen in biologischen Materialien. Durchführung einer Qualitätskontrolle

Im Rahmen der Qualitätskontrolle werden im allgemeinen die Präzision, die Spezifität, die Richtigkeit und die Empfindlichkeit einer Bestimmungsmethode als Kenngrößen für ihre Zuverlässigkeit und ihren diagnostischen Wert verwendet (73,74). Grundsätzlich sind diese Kriterien auch bei der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen gültig (69-72,75), es ergeben sich jedoch aufgrund von methodischen Eigenheiten einerseits und von strukturchemischen Eigenschaften der untersuchten Substanzen andererseits gesonderte Probleme bei der Auswertung und Interpretation der anfallenden Daten (75,76). Im vorliegenden Abschnitt werden die oben genannten Kriterien näher erläutert und ihre praktische Bedeutung für die vorliegende Untersuchung dargestellt. Zur grundsätzlichen Theorie des Radioimmuntests wird auf die spezielle Literatur verwiesen (69-72).

2.2.1. Richtigkeit

Die Richtigkeit einer Methode ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der gemessenen Menge einer Substanz und ihrer tatsächlichen Konzentration in der zu untersuchenden Probe. Nach Reeves et al. und Ekins et al. ist die Richtigkeit ein Schlüsselparameter für die Zuverlässigkeit eines Radioimmuntests, sie ist ihrerseits wiederum abhängig von der Empfindlichkeit, Spezifität, Präzision und vom systematischen Fehler (69,70). Im folgenden Abschnitt wird auf die besondere Bedeutung des systematischen Fehlers bei Radioimmuntests eingegangen und es werden Möglichkeiten zur Einschränkung dieses Fehlers angegeben.

Nach Reeves et al. sind in erster Linie fehlerhafte Korrekturen zum Ausgleich von Verlusten bei der Extraktion, Lageverschiebungen der Standardkurve sowie methodische Gründe für das Auftreten von systematischen Fehlern verantwortlich (69). Im einzelnen lassen sich folgende Möglichkeiten unterscheiden:

Bei der Extraktion einer Substanz aus einer Probe ergeben sich durch die unterschiedliche Ausbeute der Extraktionsverfahren mehr oder weniger große Verluste. Werden diese Verluste durch die Kontrolle der Wiederfindungsrate einer zugeführten radioaktiven Substanz rechnerisch ausgeglichen, so muß nach Abraham et al. auf eine ausreichende Äqulibrierungszeit geachtet werden, da sich sonst aufgrund der unterschiedlichen Verteilung und Proteinbindung von radioaktivem Tracer und zu messender Substanz falsche Korrekturfaktoren ergeben (71). Eine andere Fehlermöglichkeit ergibt sich, wenn bei der Bestimmung der Extraktionsrate und beim Radioimmuntest unterschiedlich polare Lösungsmittel zur Auflösung der Extraktionsrückstände verwendet werden, da sich abhängig von der Polarität der Substanz unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte ergeben (71). Außerdem muß darauf geachtet werden, daß der zugeführte Tracer den späteren Testansatz nicht stört.

Eine weitere Möglichkeit zur Entstehung eines systematischen Fehlers besteht darin, daß in Abhängigkeit von der Spezifität des Antikörpers und der Konzentration anderer Hormone in der Probe fälschlich höhere Konzentrationswerte gemessen werden. Außerdem ergeben sich bei der Bestimmung von chemisch nicht genau definierten Substanzen (z.B. bei Proteohormonen) durch Abweichungen in der molekularen Struktur von Standard und untersuchtem Hormon nach Verdünnung der Proben in vielen Fällen unterschiedliche Dosis-Wirkungskurven und damit mögliche Meßfehler (72).

Eine weitere Möglichkeit zur Entstehung systematischer Fehler ergibt sich durch die Anwesenheit von Hemmfaktoren in der Probenlösung, da die Standardproben im Gegensatz dazu meist in wäßriger Lösung vorliegen.

Methodische Gründe für das Zustandekommen von systematischen Fehlern stellen zum Beispiel unterschiedliche Behandlungen der Standardlösung und der Hormonprobe oder das Auftauchen von Trends bei großen Testansätzen dar.

Möglichkeiten zur Erkennung, Abschätzung und Reduktion von systematischen Fehlern lassen sich bereits aus den genannten Entstehungsursachen ableiten. Sachs unterscheidet Vergleichsversuche, Zusatzversuche und Mischungsversuche (74).
Bei den Verdünnungsversuchen ermöglicht ein Vergleich der Steigungen der Standardkurve und der Verdünnungskurve einer Probe in der Logit-Log-Darstellung eine Aussage über vorhandene Unterschiede in der immunologischen Aktivität zwischen beiden Proben (70,72). Die Parallelität der beiden Konzentrationskurven kann grafisch überprüft werden, besser eignet sich ein Chi-Quadrat-Test auf Abweichung der Steigungen der transformierten gewägten Daten (72). Dabei ist der Nachweis einer Parallelität kein eindeutiges Zeichen für eine Identität von Standardhormon und Hormon in der zu untersuchenden Probe, ein abweichender Kurvenverlauf aber ein Hinweis auf mögliche strukturchemische Unterschiede zwischen beiden (72).

Weitere Methoden zur Erkennung und Einschränkung systematischer Fehler sind die Anwendung des Kontrollkartenverfahrens auf den Radioimmuntest (75), die Anordnung der Proberöhrchen in einer zufälligen Reihenfolge zur Vermeidung von Trends (72), das Einfügen von Standardkurven an verschiedenen Untersuchungspunkten u.a.

2.2.2. Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit oder die Nachweisgrenze eines Radioimmuntests ist gekennzeichnet durch die geringste Menge an unmarkiertem Hormon, die einen signifikanten Abfall bzw. Anstieg der gebundenen Radioaktivität verursacht. Sie ist abhängig von der Präzision bei der Bestimmung des Nullpunkts und von der Steigung der Standard oder Dosis-Wirkungskurve an diesem Punkt (70,72). Abraham et al. unterscheiden zwei Arten von Empfindlichkeit: die Empfindlichkeit der Standardkurve und die Empfindlichkeit der Bestimmung von Hormonen in biologischen Flüssigkeiten (71).
Ausgehend vom Massenwirkungsgesetz beschreiben Ekins et al. in ihrer Arbeit über die theoretischen Grundlagen der Sättigungsanalyse eine mathematische Herleitung der Empfindlichkeit.

Zusammengefaßt folgern sie (70):

- Die Konzentrationen der Reaktionspartner beim Radioimmuntest bestimmen den Grad der Empfindlichkeit. Da die Empfindlichkeit von der Steigung der Dosis-Wirkungskurve am Nullpunkt und von dem Fehler bei der Bestimmung der Antwortgröße (gebundener Tracer/freier Tracer = R) am Nullpunkt abhängt, muß der Einfluß der Konzentrationen der Reaktionspartner auf beide Einflußgrößen beachtet werden.
- Der Fehler bei der Bestimmung der Antwortgröße am Nullpunkt setzt sich aus dem relativen experimentellen Fehler und dem statistischen Fehler (counting error) bei der Messung von antikörpergebundener und freier Aktivität zusammen.
- Ist der statistische Fehler minimal, so ist die maximale Empfindlichkeit durch den Quotienten aus dem experimentellen Fehler und der Gleichgewichtskonstanten limitiert.
- Ist der experimentelle Fehler gleich Null, so ist die Empfindlichkeit maximal bei einer Antikörperkonzentration von 3/K (K = Gleichgewichtskonstante) und einer Tracerkonzentration von 4/K bei einem R_0 von 1.
- Die Empfindlichkeit steigt mit der Quadratwurzel der Assoziationskonstanten.

Aus diesen von Ekins angegebenen Beziehungen lassen sich die günstigsten Bedingungen zur Empfindlichkeitssteigerung herleiten.

2.2.3. Spezifität

Die Spezifität eines Antiserums kennzeichnet das Ausmaß, in dem andere als die zu bestimmenden Hormone um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren und damit die Richtigkeit der Messung verfälschen.
Nach Midgley et al. ist dieser störende Einfluß anderer Hormone auf immunologische Kreuzreaktionen, unerwünschte radioaktive Substanzen und Unterschiede in der Zusammensetzung der Inkubationslösung zurückzuführen (72). Dabei hängt das Ausmaß der Kreuzreaktion etwa

zweier Hormone am Antikörper von den unterschiedlichen Bindungsenergien bzw. Affinitätskonstanten ab und wird weiterhin von den Konzentrationen an Antikörper, markiertem Hormon und störendem Hormon bestimmt (70). Zur Bestimmung der Identität von Standard und zu bestimmendem Hormon können die oben genannten Verdünnungskurven herangezogen werden. Sie zeigen jedoch nach Ekins bei Vorliegen einer einzigen Antikörperbindungsstelle selbst bei einer hundertfachen Differenz der Affinitätskonstanten kein wesentliches Abweichen von der Parallelität. Erst bei der Existenz von verschiedenen Bindungsstellen mit unterschiedlicher Spezifität weichen die Kurven signifikant von einander ab (70).
Eine weitere Möglichkeit für eine Kreuzreaktion ergibt sich nach Midgley dann, wenn die Antikörperbildung durch eine nicht völlig gereinigte Hormonpräparation induziert wird, wie es oft bei den Polypeptidhormonen der Fall ist. Damit kann ein Antiserum Antikörperpopulationen gegen verschiedene Hormone enthalten (72).

2.2.4. Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Genauigkeit oder Reproduzierbarkeit einer Meßmetnode. Sie wird bestimmt durch die Abweichungen der Einzelwerte um ihren Mittelwert bei mehrfachen Messungen am gleichen Objekt (73,74).

Ausgehend von normal verteilten Meßfehlern gibt man als Maß für die Präzision die Standardabweichung s_x, die Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$, oder den Variationskoeffizienten an. Eine andere Möglichkeit ist die Angabe von Vertrauensbereichen, die den zu bestimmenden Parameter mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit enthalten. Im allgemeinen wird dabei der 95%-Vertrauensbereich gewählt.

Zur Charakterisierung der Zuverläßigkeit einer Bestimmungsmethode werden im allgemeinen die Präzision in der Serie (Intra-Assay-Varianz) und die Präzision von Tag zu Tag (Inter-Assay-Varianz) angegeben.
Nach Brand ist jedoch die Normalverteilung von Meßfehlern kein Naturgesetz (82). Da die Ursachen von Meßfehlern sehr komplex

sein können und sich außerdem Abweichungen von der Symmetrie und Unabhängigkeit der Fehler ergeben können, lassen sich keine Verteilungsfunktionen finden, die das Verhalten von Meßfehlern in allen Fällen beschreiben. Im Einzelfall muß man z.B. durch einen Chi-Quadrat-Test prüfen, ob die Meßfehler einer Normalverteilung folgen (82). Midgley hat bei verschiedenen Radioimmuntests die Existenz von normalverteilten Meßfehlern im Bereich verschiedener Konzentrationsbereiche der Dosis-Wirkungskurve nachgewiesen (72).

Bei einem Radioimmuntest hängt die Präzision von der Steigung der Dosis-Antwortkurve und von dem Fehler bei der Bestimmung des jeweiligen Antwortparameters ab (69,70,72). Bedingt durch den sigmoidalen Verlauf der Standardkurve ist trotz einer symmetrischen Streuung des Antwortparameters um einen Mittelwert bei einem festgelegten Konzentrationsbereich die Streuung des abgelesenen Meßwertes nur im mittleren geraden Teil der Standardkurve symmetrisch verteilt (72).

Da die manuelle Ergebnisberechnung bei Radioimmuntests selbst fehleranfällig und zeitaufwendig ist, wurde bereits auf die Auswertung mit Computerprogrammen zurückgegriffen (76,78,79,80). Zur Berechnung der Kurvenparameter einer Regressionsgeraden mit der Methode der kleinsten Quadrate bzw. mit der Maximum-Likelihood-Methode wurde die Dosis-Wirkungskurve in eine lineare Form transformiert. In der Praxis wird z.B. die Logit-Log-Transformation verwendet, eine Zusammenstellung anderer Näherungsverfahren findet sich bei Vogt (78).

Ein Problem bei der Durchführung der Regressionsanalyse stellt das schon angesprochene Abweichen von der Homogenität der Restvarianz (Homoskedastizität) und von der Normalität dar (72,81). Da die angegebene Logit-Log-Transformation die Homogenität der Restvarianz noch verschlechtert, haben Rodbard et al. eine Methode entwickelt, die es durch Einführung von Wägefaktoren für jeden Punkt der Standardkurve gestattet, eine genaue Berechnung der Kurvenparameter vorzunehmen. Außerdem haben Rodbard et al. eine Möglichkeit zur

Konstruktion des Vertrauensbereichs der Regressionsgeraden angegeben (76).

Die praktische Bedeutung der obenstehenden Überlegungen richtet sich nach den Anforderungen der jeweiligen Untersuchung. So hat z.B. die Existenz von unterschiedlichen Varianzen eine besondere Bedeutung für den Vergleich von Meßergebnissen mit verschiedenen Konzentrationen, wie es beispielsweise bei Verlaufsstudien geschieht. Allerdings ist zu bedenken, daß technische Details, wie z.B. methodische Fehler bei der Extraktion, die eben genannten Probleme überlagern können. Rodbard et al. haben zur Umgehung der genannten Schwierigkeiten ein praktisches Kontrollverfahren zur Überwachung der Qualität eines Radioimmuntests eingeführt. Bei dieser Methode werden unter Benutzung von Kontrollkarten die wesentlichen Parameter eines Radioimmuntests kontinuierlich kontrolliert (75). Auch bei der vorliegenden Untersuchung wurde auf die Anwendung von Kontrollkarten zurückgegriffen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Untersuchungsgut

Als Untersuchungsgut dienten zweiundneunzig Fruchtwasserproben, die durch transabdominelle Amniozentese gewonnen wurden. Die Proben wurden sofort nach der Punktion bei $+4^{o}$ C zentrifugiert und der Oberstand bei -20^{o} C tiefgefroren.

Für die Amniozentesen galten folgende Indikationen:

entscheidend für die Frühamniozentesen waren genetische Belastungen, erhöhtes Alter der Mutter, frühere Geburten von missgebildeten Kindern, gesicherte Rötelninfektionen sowie anders indizierte Schwangerschaftsabbrüche. Als Indikation für die Spätamniozentesen galt die Rhesus-Inkompatibilität. Bei der Bearbeitung des Kollektivs wurden Proben von Patientinnen gesondert berücksichtigt, bei denen sich Fehlregulationen der Fruchtwasser-Dynamik, Störungen der feto-plazentaren Einheit, endokrine Fehlregulationen, exogene Glucocorticoidgaben sowie eine Behandlung mit Radiopharmaka als mögliche Störfaktoren ergaben. Fruchtwasserproben mit zu hohem Mekoniumgehalt oder Blutbeimengung wurden verworfen.

Bei den Patientinnen mit Rhesus-Inkompatibilität lagen zum Teil mehrere Proben verschiedenen Datums vor, so daß sich hier einzelne Verläufe kontrollieren ließen.

3.2. Materialien

3.2.1. Antiserum

Das Antiserum für den Radioimmuntest wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. P. Vecsei/Heidelberg zur Verfügung gestellt. Bei der Herstellung wurden weiße Neuseeland-Kaninchen mit einem Cortisol-21-Hemisuccinat, gekoppelt an Rinderserumalbumin, immunisiert. Dabei wurde 1 mg des Antigens in 0.1 ml Kochsalzlösung und 0.5 ml vollständigem Freund's Adjuvans (DIFCO) unmittelbar vor der i.m. Injektion aufgelöst. Die Injektionen wurden alle zwei bis vier Wochen wiederholt. Nach sechs Monaten hatten sechs von acht

immunisierten Kaninchen einen genügend hohen Antikörperspiegel. Die Proben wurden nach Erhalt in 20 Mikroliter Portionen aufgeteilt und in Eppendorf-Gefäßen bei -20° C gelagert.

3.2.2. Reagenzien

Äthanol (Nr. 972), Dichlormethan (Nr. 6050), Cyclohexan (Nr. 9666), Benzol (Nr. 1783), Methanol (Nr. 6009), Lysozym (Nr. 5281), Borsäure (Nr. 165), 2,5-Diphenyloxazol (PPO) (Nr. 2946), 2,2-p-Phenylenbis-(5-phenyl-Oxazol) (POPOP) (Nr. 7249), (Naphtalin (Nr. 6200), Aethylenglycol (Nr. 9621), Dioxan (Nr. 9671), Essigsäure (Nr. 60) wurden von der Firma Merck Darmstadt bezogen und hatten die Qualität "pro analysi".

Norit-A-Aktivkohle (Nr. 30890) und Dextran T 70 stammten von der Firma Serva, Heidelberg. Gamma-Globulin 16 % wurde von der Firma Immuno-AG, Heidelberg bezogen.

ß-Glucuronidase/Arylsulfatase (Nr. 127060) der Firma Boehringer, Mannheim besaß eine enzymatische Aktivität 5,2 U = 100 000 Fishman-Einheiten Beta-Glucuronidase/ml und 2,6 U = 57 000 Roy-Einheiten Arylsulfatase/ml.

3.2.3. Steroide

Folgende Steroide wurden von der Firma Merck bezogen:

4-Pregnen-11ß, 17α, 21-triol-3,20-dione (Cortisol, Nr. 24608),
4-Pregnen-17α, 21-diol-3,11,20-trione (Cortison, Nr. 8960),
4-Pregnen-11ß, 21-diol-3,20-dione (Corticosteron, Nr. 24618),
4-Pregnen-3,20-dione (Progesteron, Nr. 24614)
4-Pregnen-21-01-3,20-dione (Desoxycorticosteron, Nr. 24605).

Von der Firma Steraloids, New York stammten die Steroide:
4-Pregnen-6ß, 11ß, 17α, 21-tetrol-3,20-dione (6ß-Hydroxycortisol, Nr. Q 3730), 4-Pregnen-11ß, 17α, 21-triol-3,20-dione-21-Sodium Sulfate (Cortisolsulfat, Nr. Q 2525), 4-Pregnen-17α,21-diol-3,20-dione (11-Desoxycortisol,Nr. Q 1610).

3.2.4. Radioaktive Materialien

Die Firma New England Nuclear lieferte die folgenden radioaktiv markierten Steroide (Best.Nr. in Klammern):

[1,2-^{3}H] Hydrocortison, (NET 185). Spezifische Aktivität 40 Ci/mmol
[1,2-^{3}H] Cortison, (NET 183)
[1,2-^{3}H] Progesteron,(NET 208)
[1,2-^{3}H] Androstendion, (NET 294)
[1,2-^{3}H] 17α-Hydroxyprogesteron, (NET 332)
[1β,2β-^{3}H] Testosteron, (NET 187)
[1,2-^{3}H] Dehydroepiandrosteron, (NET 479)
[1,2-^{3}H] Aldosteron, (NET 105)
[1,2-^{3}H] Corticosteron, (NET 182)

3.2.5. Reagenzgefäße

Der Radioimmuntest wurde in 1.5 ml-Polystyrol-Röhrchen (40 x 10) durchgeführt, für die Extraktionen wurden Glaskolben mit Schliffstopfen (100 x 15) benutzt.

Die enzymatische Hydrolyse wurde ebenfalls in Glaskolben mit Schliffstopfen (120 x 15) durchgeführt. Weiter wurden Eppendorf-Röhrchen (Best.-Nr. 3810), Glas- und Plastikzählgefäße (Fa. Zinsser) und Polystyrol-Röhrchen (100 x 15) benutzt.

Für die Säulenchromatografie wurden Glassäulen der Firma New England Nuclear (Best.-Nr. Nea 050) mit einer Länge von 18 cm und einem inneren Durchmesser von 1 cm verwendet.

3.2.6. Apparative Ausrüstung

Eppendorf-Zentrifuge (Heräus Christ Nr. 1605)
Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard Tri Carb 3380)

Sartorius-Mikrowaage (Nr. 4125)
Brutschrank für die Enzymreaktion
Magnetrührer, Vortex-Mixer
Flüssigkeitsdosiergerät (Brand-Dispensette)
Oxford-Pipetten (Kontrol-Technik München)
Hamilton-Mikrolitерspritzen (0.05, 0.1 und 1,0 ml Fassungsvermögen)

3.3. Herstellung der Gebrauchslösungen

Für die Durchführung der Analysen wurden die folgenden, z.T. jeweils frisch angesetzten Lösungen verwendet:

3.3.1. Antiserum

Es wurde jeweils eine 20 µl-Probe des Antiserums bei +4° C aufgetaut und mit 20 ml gekühltem Lysozym-Phosphat-Puffer versetzt. Von dieser Lösung mit der Verdünnung 1 : 1 000 wurden jeweils Verdünnungsstufen von 1 : 10 000, 1 : 15 000 und 1 : 20 000 hergestellt und in einem Vorversuch getestet. Der endgültige Anikörpertiter für den Hauptversuch entsprach der Verdünnungsstufe, bei der in der Leerprobe (sog. Nullpunkt der Standardkurve) etwa 45 % des zugeführten radioaktiven Hormons gebunden wurde (vgl. Beschreibung des Radioimmuntests).

Die Antikörperlösung wurde für jeden Versuchsansatz neu hergestellt; dabei wurde wegen der Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen streng bei +4° C gearbeitet.

3.3.2. Cortisol-Standardlösung

Einmalig wurde 5 mg Cortisol auf einer elektronischen Feinwaage abgewogen und in 500 ml 100proz. Äthanol aufgelöst und sofort wegen der Verdampfungsgefahr und der damit verbundenen Konzentrationsänderung auf +4° C gekühlt. Zur Herstellung der Stammlösung für die Standardreihe wurde jeweils 1 ml dieser Lösung mit 5proz. Äthanol auf 100 ml aufgefüllt. Anschließend wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

	Standardlösung	Verdünnung
1.	1 000 pg / 0.1 ml	0.4 ml Stammlösung + 3.6 ml Äthanol
2.	500 pg / 0.1 ml	2.0 ml Lösung Nr. 1 + 2.0 ml Äthanol
3.	250 pg / 0.1 ml	2.0 ml Lösung Nr. 2 + 2.0 ml Äthanol
4.	100 pg / 0.1 ml	1.6 ml Lösung Nr. 3 + 2.4 ml Äthanol
5.	50 pg / 0.1 ml	2.0 ml Lösung Nr. 4 + 2.0 ml Äthanol
6.	25 pg / 0.1 ml	2.0 ml Lösung Nr. 5 + 2.0 ml Äthanol
7.	10 pg / 0.1 ml	1.6 ml Lösung Nr. 6 + 2.4 ml Äthanol
8.	5 pg / 0.1 ml	2.0 ml Lösung Nr. 7 + 2.0 ml Äthanol

Die Standardreihe wurde mit Enzympipetten und mit Hamilton-Mikroliterspritzen pipettiert. Zur Verdünnung wurde 5proz. Äthanollösung verwendet.

3.3.3. Radioaktives Cortisol

Es wurde als Ausgangssubstanz radioaktiv markiertes Cortisol jeweils mit einer spezifischen Aktivität 40 Ci/mmol in einer Benzol-Äthanol-Lösung (9 : 1) etwa alle drei Monate neu bezogen. 0.1 ml dieser Lösung mit 0.1 mCi entsprechend 0.00092 mg (2.5×10^{-9} mol) Cortisol wurden bei 40° C unter nachgereinigtem Stickstoff verdampft und mit 100 ml abs. Äthanol versetzt. Entsprechend der Ausbeute des Zählgerätes von etwa 28 % betrug die Zählrate in 0.1 ml dieser Lösung etwa 75 000 cpm. Diese Lösung diente als Ausgangslösung für die anderen im Versuchsansatz verwendeten Verdünnungen:

- Zur Durchführung eines Radioimmuntests wurden 3 ml der Ausgangslösung unter Stickstoff bei 40° C eingedampft und mit ca. 27 ml Lysozym-Borat-Puffer auf eine Aktivität von etwa 6 000 cpm / 0.1 ml eingestellt.
- Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate bei der Äthanol-Fällung wurde die zur Fällung verwendete Äthanollösung auf eine Aktivität von 1 200 cpm / 0.1 ml eingestellt.
- Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Dichlormethan-Extraktion wurde Lysozym-Phosphat-Puffer auf eine Aktivität von etwa 200 cpm / 0.1 ml eingestellt.

- Für die Säulenchromatografie und Enzymhydrolyse wurde abs. Äthanol auf eine Aktivität von etwa 2 000 cpm / 0.1 ml eingestellt.

Die radioaktiven Lösungen wurden vor jeder Versuchsreihe neu hergestellt.

3.3.4. Pufferlösungen

Zur Herstellung des Borat-Puffers wurden 6.184 g Borsäure mit 7.456 g Kaliumchlorid versetzt und mit Aqua bidest. auf 1 000 ml aufgefüllt. Zu 1000 ml dieser Lösung wurden 78 ml 0.1 N Natronlauge gegeben und mit Aqua bidest. auf 2 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert betrug 7.8. Für den verwendeten Lysozym-Borat-Puffer wurden zu jeweils 100 ml Borat-Puffer 0.1 g Lysozym zugefügt.

Zur Durchführung der Enzymhydrolyse wurde ein Azetat-Puffer (0.2 N ; pH 4.75) verwendet. Dabei wurden 57.1 ml 1 N Natronlauge und 5.7 ml 100proz. Essigsäure vermischt und mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt.

3.3.5. Aktivkohle-Lösung

Als Ausgangslösung diente eine Mischung aus 160 ml Borat-Puffer und 1 ml Immunglobulin. 80 ml dieser Lösung wurden mit 5 g Aktivkohle versetzt und auf einem Magnetrührer durchmischt. Die übrigen 80 ml wurden mit 0.1 g Dextran versetzt. Die Arbeitslösung bestand aus je 10 ml Kohle-Lösung und 60 ml Dextranlösung und wurde jeweils neu hergestellt.

3.3.6. Bray's-Szintillationsflüssigkeit

Die Szintillationsflüssigkeit bestand aus folgenden Substanzmengen:

- 10 g 2.5 Diphenyl-Oxazol (PPO)
- 0.5 g 2.2-p-Phenylenbis-(5-phenyl-oxazol) (POPOP)
- 150 g Naphtalin
- 250 ml Methanol
- 50 ml Äthylenglycol

aufgefüllt auf 5 l mit Dioxan.

Die Flüssigkeit wurde etwa einen Tag vor Ausführung der Versuche hergestellt und auf dem Magnetrührer gründlich durchmischt.

3.3.7. Lösungen für die Säulenchromatografie

Verwendet wurden zwei verschiedene Fließmittel-Systeme:
System A bestand aus einer Mischung von Cyclohexan, Benzol und Methanol (6 : 4 : 1); System B bestand aus einer Mischung von Cyclohexan, Dichlormethan, Methanol, H_2O (100 : 80 : 15 : 1).

3.4. Herstellung der Säulenpackung für die Chromatografie

Zur Beschichtung einer Säule wurden jeweils 850 mg Sephadex - LH 20 abgewogen und in 5 ml Methanol etwa 10 Stunden gequollen. Die Glassäulen wurden senkrecht eingespannt und am Auslauf wurde ein kurzer Gummischlauch befestigt. Als Bett für die Säulenfüllung diente ein kleines Stück Glaswolle in der Auslaufspitze, das mit etwas Seesand (geglüht) überschichtet wurde. Anschließend wurde etwas Methanol zur Entlüftung des Auslaufs auf die Säule gegossen und der Gummischlauch mit einer Klemme verschlossen.

Das vorbereitete Gel wurde daraufhin zügig an einer Pasteur-Pipette entlang eingefüllt und der Auslauf nach etwa 5 min. geöffnet. Nach mehrfachem Spülen mit Methanol wurde die Säule mit einem Überstand an Methanol gelagert. Mehrere Stunden vor der Benutzung wurden die Säulen mit 40 ml Fließmittel entsprechend dem achtfachen Packungsvolumen umgequollen; es wurde ein kleiner Flüssigkeitsüberstand über die Geloberfläche belassen.

Zum Auftragen der Proben wurde in jede Säule eine abgesägte Pasteur-Pipette eingeführt, deren Spitze kurz vor der Geloberfläche endete. Die Durchflußgeschwindigkeit eines Lösungsmittels betrug etwa 8 ml / cm^2.h, die Höhe der Säulenpackung betrug 5 cm.

3.5. Ausführung der Analysen

3.5.1. Äthanol-Fällung

0.2 ml Fruchtwasser und 0.4 ml abs. Äthanol (mit etwa 1 000 cpm [1.2-^{3}H] Cortisol wie beschrieben) wurden ca. 30 min. bei RT in einem Eppendorf-Röhrchen gelagert und anschließend 4 min. bei 11 600 g in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. 0.1 ml des Oberstands wurden mit 1.4 ml Aqua bidest. verdünnt, 2 x 0.1 ml dienten als Probe für den Cortisol-Radioimmuntest und 1 ml wurde zur Bestimmung der Wiederfindungsrate verwendet. Zur Bestimmung des 100 %-Wertes der Wiederfindung wurde 0.1 ml des radioaktiv markierten Äthanol mit 1.4 ml Aqua bidest. verdünnt und 1 ml davon gemessen.

3.5.2. Dichlormethan-Extraktion

0.2 ml Fruchtwasser und 0.5 ml Lysozym-Borat-Puffer (mit insgesamt 1 000 cpm) wurden in 14 x 23 cm Extraktionskolben gefüllt und 1/2 h äquilibriert. Daraufhin wurden die Proben mit 5 ml Dichlormethan versetzt und 1 min geschwenkt, die untere Phase wurde jeweils mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in ein Spitzglas überführt. Nach dreimaliger Extraktion wurde der Inhalt des Spitzglases bei 35^{o} C unter Stickstoff getrocknet und anschließend mit 3 ml 5proz. Äthanol aufgefüllt. Wiederum dienten 2 x 0.1 ml als Probe für den Radioimmuntest und 1 ml zur Bestimmung der Wiederfindungsrate.

3.5.3. Säulenchromatografie

Für die vergleichende Analyse nach fünf Methoden wurden die Fruchtwasserproben wie folgt behandelt: jeweils 0.4 ml Fruchtwasser wurde mit 0.8 ml Äthanol versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Nach anschließender Zentrifugation wurden 2 x 0.1 ml des Oberstands für die Äthanol-Fällung verwendet; 0.2 ml dienten zur Analyse mit der Säulenchromatografie, und

ebenfalls 0.2 ml wurden für die enzymatische Hydrolyse benutzt.

Zur Durchführung der Säulenchromatografie wurden 0.2 ml des Überstands unter Stickstoff in einem Spitzglas bei 32° C eingedampft und mit 500 µl eines Cyclohexan Dichlormethan Methanol Wasser-Gemisches wieder aufgelöst, wobei Verdampfungsrückstände an der Wand des Röhrchens vorsichtig in die Spitze gespült wurden. Die Probe wurde nochmals eingedampft und mit 0.2 ml Fließmittel aufgenommen. Für den Probenauftrag wurde die Hauptmenge des Fließmittelüberstands auf der Säule zunächst abgelassen, der Auslauf der Säule geschlossen und die vorbereitete Pasteur-Pipette aufgesetzt. Nachdem der Rest des Flüssigkeitsüberstands durch Öffnen des Auslaufs eben in die Säule eingezogen war, wurde die Probe mit einer Oxford-Pipette bei geschlossenem Auslauf über die Pasteur-Pipette auf die Geloberfläche geschichtet und der Auslauf erneut bis zum Einziehen der Probe geöffnet. Das Spitzglas wurde mit 0.2 ml Fließmittel nachgewaschen und diese Waschflüssigkeit ebenfalls auf die Säule gegeben. Dann wurden die Säulen mit 7 x 1 ml Fließmittel beschickt und das Eluat verworfen (Vorlauf). Für den Hauptlauf wurden 6 x 1 ml Fließmittel auf die Säule gegeben, das Eluat in Zählgefäßen aus Glas gesammelt und bei 40° C unter Stickstoff eingedampft. Nach Auflösen des Rückstands mit 1.6 ml 5proz. Äthanol wurden 2 x 0.1 ml direkt mit dem Radioimmuntest bestimmt und 1 ml zur Bestimmung der Wiederfindungsrate verwendet. Bei Verwendung des Cyclohexan Benzol Methanol-Gemischs als Fließmittel wurden die ersten 10 ml als Vorlauf verworfen und die folgenden 6 ml als Hauptlauf weiter verarbeitet.

3.5.4. Enzymatische Hydrolyse

Nach Durchführung der Äthanol-Fällung wurden je 0.2 ml Oberstand in zwei 20 ml-Glaskolben überführt und eingedampft. Anschließend wurden die Rückstände in 1 ml Azetat-Puffer aufgenommen und 0.05 ml Enzympräparat zugefügt. Die Lösung wurde zur Vermeidung von einer Schaumbildung vorsichtig durchmischt und 48 h bei 37° C in einem Brutschrank inkubiert. Nach Abkühlung bei einer Raumtemperatur wurde dreimal mit je 5 ml Dichlormethan extrahiert und der Extrakt mit 1 ml Aqua bidest. nachgewaschen, wie bereits beschrieben. Eine der beiden Proben wurde eingedampft und der Rückstand mit 0.2 ml des Cyclohexan Dichlormethan Methanol Wasser-Gemischs aufgenommen. Dann wurde die bereits beschriebene Säulenchromatografie durchgeführt, wobei im letzten Verdünnungsschritt mit 1.5 ml 5proz. Äthanol verdünnt wurde. Die andere Probe wurde ebenfalls eingedampft und der Rückstand mit 2 ml 5proz. Äthanol aufgenommen. 2 x 0.1 ml wurden mit dem Radioimmuntest bestimmt; 1 ml diente zur Bestimmung der Wiederfindungsrate.

3.5.5. Radioimmuntest

Es wurden jeweils 0.1 ml Probe oder Standardlösung, 0.1 ml Lösung mit radioaktiv markiertem Cortisol und 0.5 ml Antiserum in ein Reagenzglas pipettiert und auf einem Vortexmixer vorsichtig durchmischt. Nach einer vierstündigen Inkubation bei +4° C wurde 0.2 ml Kohlelösung in die Deckel der Reagenzgefäße gegeben und die Proben wurden nach Aufsetzen der Deckel mit Aktivkohle gleichzeitig durchmischt. Nach einer Äquilibrierungszeit von 5 min wurde 4 min zentrifugiert und 0.7 ml Oberstand in ein Zählgefäß gegeben. Nach Zugabe von 12 ml Szintillationsflüssigkeit wurde 5 min gezählt. Auf diese Weise wurden jeweils 40 Proben gleichzeitig bearbeitet; zur Kontrolle von Temperaturschwankungen und anderen Abweichungen wurden mehrfach Standardproben eingefügt. Die Standardkurven wurden jeweils in einer Dreifachbestimmung ermittelt und die unbekannten Proben doppelt bestimmt.

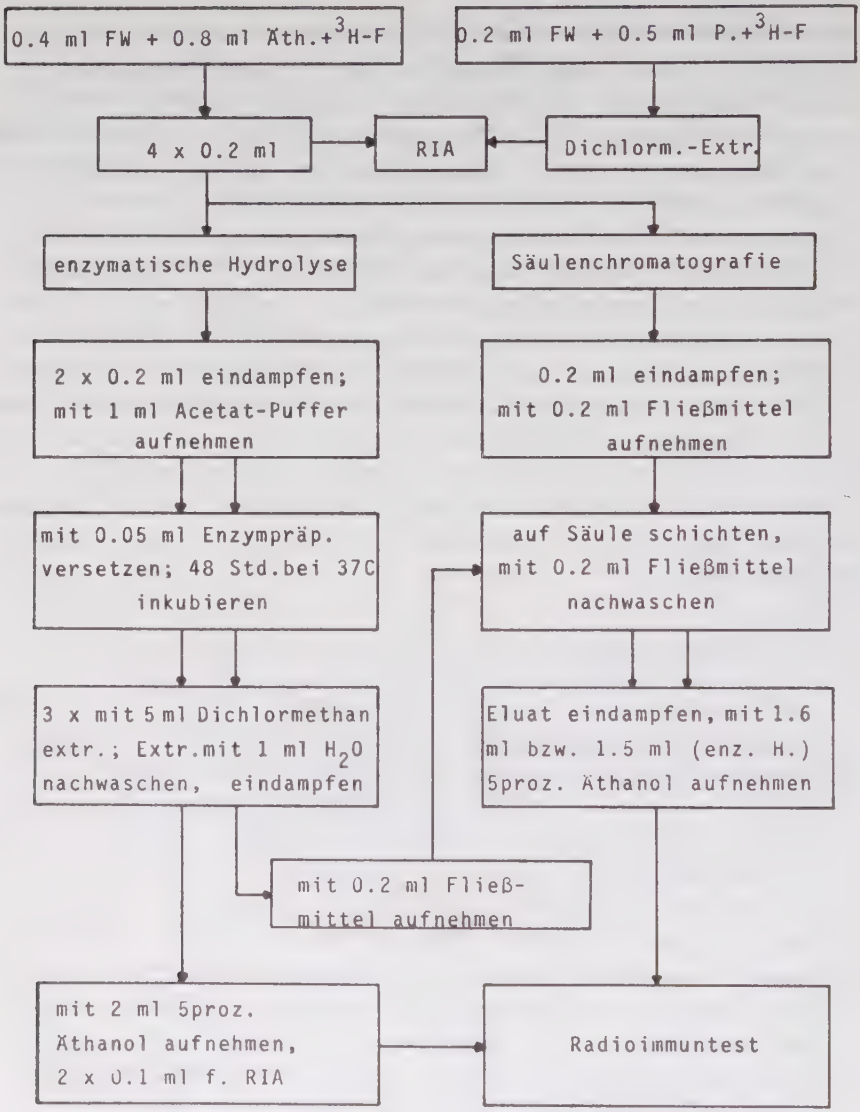


Abb. 4: Flußdiagramm der Analyseschritte

3.6. Berechnungen

Die Cortisol-Konzentrationen der Proben wurden wie folgt berechnet (in ng / ml):

Äthanol-Fällung:

$$0.45 \times \text{abgel. Wert aus Kurve} \times \frac{\text{Recovery-Probe} \times 3}{100\%\text{-Recovery} \times 2}$$

Dichlormethan-Extraktion:

$$0.15 \times \text{abgel. Wert aus Kurve} \times \frac{\text{Recovery-Probe}}{100\%\text{-Recovery} \times 5}$$

enzymatische Hydrolyse + Säulenchromatografie:

$$0.225 \times \text{abgel. Wert aus Kurve} \times \frac{\text{Recovery-Probe} \times 9}{100\%\text{-Recovery}}$$

Säulenchromatografie:

$$0.24 \times \text{abgel. Wert aus Kurve} \times \frac{\text{Recovery-Probe} \times 9.6}{100\%\text{-Recovery}}$$

enzymatische Hydrolyse:

$$0.3 \times \text{abgel. Wert aus Kurve} \times \frac{\text{Recovery-Probe} \times 6}{100\%\text{-Recovery}}$$

Die Dokumentation der anfallenden Daten und die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde teilweise auf einer IBM/370-168 (Betriebssystem OS/VS 2) Datenverarbeitungsanlage vorgenommen. Dabei wurden alle Daten und Versuchsergebnisse einer Versuchsperson auf eine Lochkarte übertragen und so angeordnet, daß sie als Datenkarte für die Programmiersprachen Fortran und SPSS verwendet werden konnten. Fortran IV wurde für die Dokumentation der anfallenden Daten und für einfache Datentransformationen benutzt (IBM-Manual GC28-6515-10), SPSS in der Programmversion 7 wurde für die statistischen Berechnungen verwendet (86).

4. Ergebnisse

4.1. Methodische Untersuchungen

Im folgenden Teil der Arbeit wird zunächst auf die Ergebnisse der Qualitätskontrollversuche der einzelnen Analyseschritte eingegangen und der Einfluß von unterschiedlichen Versuchsbedingungen auf die Güte und die Praktikabilität der Experimente dargestellt. Dabei wird zunächst auf den eigentlichen Radioimmuntest und danach auf die einzelnen Trennverfahren eingegangen. Im zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse dargestellt, die sich bei der Analyse der Fruchtwasserproben ergaben.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden teilweise statistische Methoden verwendet, die über eine reine Beschreibung der anfallenden Daten hinausgehen und Rückschlüsse auf die dem Kollektiv zugrunde liegenden Grundgesamtheiten ermöglichen sollen. Dabei sind diese Methoden der analytischen Statistik an bestimmte Grundvoraussetzungen gebunden. Eine wesentliche Bedingung ist, daß das untersuchte Kollektiv eine Zufallsstichprobe aus einer definierten Grundgesamtheit darstellt. Das Krankengut einer Klinik stellt jedoch in den meisten Fällen keine Zufallsstichprobe dar und die zugehörige Grundgesamtheit läßt sich oft schwer definieren, so daß die Verallgemeinerungsfähigkeit der gewonnenen Erkenntnisse fraglich ist. Eine zusammenfassende Kritik gibt L. Sachs (77). Werden im folgenden Abschnitt einige statistisch-analytische Verfahren verwendet, so sind deren Ergebnisse wegen der Auswahl und der Größe des Kollektivs den ebengenannten Einschränkungen unterworfen.

4.1.1. Trennung des Antikörper-gebundenen Hormonanteils vom freien Hormon

Die Trennung des freien vom gebundenen Hormonanteil wurde mit einer Dextran-Aktivkohle-Lösung durchgeführt. Dabei bestimmt das Ausmaß und die Güte dieses Trennschrittes die Zuverlässigkeit des Radioimmuntests wesentlich mit. Die Anwendung einer Aktivkohle-Lösung ist mit der Forderung verbunden, daß der freie Hormonanteil möglichst vollständig an die Kohle absorbiert wird und der gebundene Anteil in der Lösung verbleibt und zur Aktivitätsbestimmung zur Verfügung steht. Abb. 5 stellt den Einfluß der Kohle-Äquilibrierungszeit und den Einfluß der eingesetzten Menge an Kohlelösung auf den Grad der Trennung von gebundenem und freiem Hormonanteil dar. Dabei wurde eine Aktivitätsmenge von 3 000 cpm an markiertem Hormon in einem Probevolumen von 0.9 ml gelöst und die Restaktivität im Überstand nach Ausführung des Trennschrittes gemessen. Bei diesem Versuch wird das Ausmaß der Bindung von Antikörper-gebundenem Hormon an die Kohlepartikel vernachlässigt. Die Abbildung zeigt, daß eine maximale Trennung nach etwa 13 bis 15 min erreicht war und daß dieses Gleichgewicht bei Verwendung einer größeren Menge an Aktivkohle erwartungsgemäß früher erreicht und der Trennungsgrad besser war. Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung scheint dabei wesentlich von der Menge der verfügbaren Bindungsstellen an den Aktivkohlepartikeln abzuhängen. Unberücksichtigt blieb in den Versuchen der Einfluß von Temperatur, pH und Puffer sowie der Konzentrationen von Dextran und Protein.

Bei der Durchführung der Experimente wurde die Kohlelösung in die Deckel der Reagenzgefäße gegeben und diese nach Aufsetzen kräftig geschüttelt. Auf diese Weise blieben die Kohlekontaktzeiten für alle Proben konstant. Die Kohlekontaktzeit betrug 5 min, die Menge an Kohle-Lösung 0.2 ml und die Versuchstemperatur einheitlich 4^{o} C. Bei dieser Technik betrug die Restaktivität im Überstand durchschnittlich noch 26 cpm (n = 10) entsprechend 0.5 % der Gesamtaktivität.

Andere nicht dargestellte Versuche zeigten, daß nur frisch angesetzte Kohle-Lösungen ein befriedigendes Trennergebnis aufwiesen.

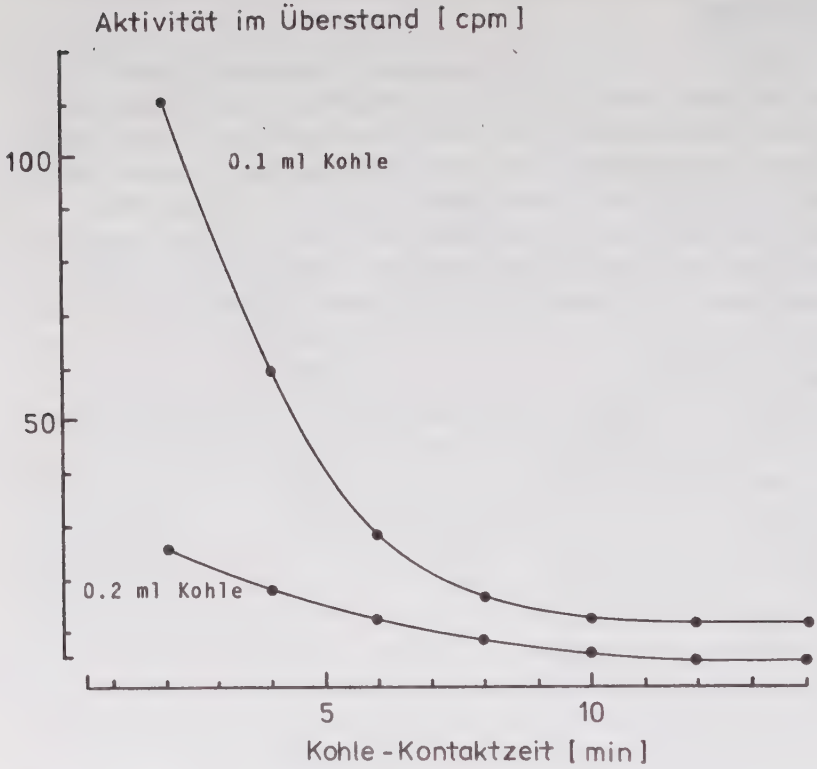


Abb. 5: Einfluß der Kohle-Äquilibrierungszeit und der eingesetzten Menge an Kohle-Lösung auf den Grad der Trennung von Antikörper-gebundenem Hormonanteil und freiem Hormon. Dabei wurde eine Aktivitätsmenge von 3000 cpm markiertem Hormon in einem Probevolumen von 0.9 ml gelöst und die Restaktivität im Überstand nach der Kohle-Trennung gemessen (senkrechte Achse).

4.1.2. Antikörper-Titerkurve

Die Abb. 6 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Antikörpertiter einerseits und dem Anteil an der Gesamtmenge (G) des radioaktiv markierten Hormons andererseits, der ohne Zusatz von unmarkiertem Hormon am Antikörper gebunden wird (Bo). Dieser Anteil wird auch als Nullpunkt der Standardkurve bezeichnet und er wird im folgenden als prozentuales Verhältnis ausgedrückt (Bo/G x 100). Auf die Standardkurve wird später noch genauer eingegangen (vgl. Abschnitt 4.1.4.)

Die Kurve in Abb. 6 wurde unter den festgelegten Versuchsbedingungen aufgenommen: Gesamtaktivität ca. 5 000 cpm, Antikörpervolumen 0.5 ml, Gesamtvolumen der Probe 0.9 ml, Inkubationszeit 3 h bei 4^{o} C, Volumen der Kohlelösung 0.2 ml, Kohle-Äquilibrierungszeit 5 min. Der Antikörper wurde nach Erhalt in jeweils 0.02 ml Portionen aufgeteilt und bei -20^{o} C gelagert. Vor der Durchführung eines Radioimmuntests wurde jeweils eine entsprechende Probe aufgetaut und in einem Vorversuch eine abgekürzte Titerkurve aufgenommen, um eine annähernd gleichbleibende Arbeitsverdünnung des Antikörpers zu gewährleisten. Bei einer 50proz. Bindungsrate (Arbeitsbereich des Radioimmuntests) lag die Verdünnungsstufe des Antikörpers etwa bei 1 : 12 000.

Die Abb. 7 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Antikörpertiter einerseits und dem antikörpergebundenen Anteil der Aktivität am Nullpunkt der Standardkurve andererseits bei acht verschiedenen Radioimmuntests. Wie die Abbildung zeigt, liegen die Titerkurven ziemlich eng beisammen; ein Absinken des Antikörpertiters nach einem längeren Zeitraum konnte nicht beobachtet werden.

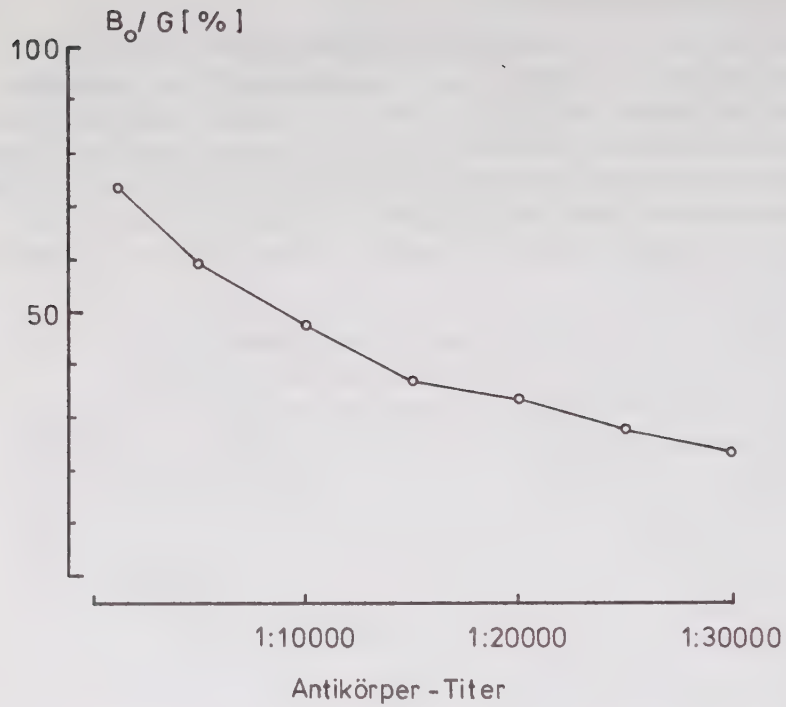


Abb. 6: Antikörper-Titerkurve. Die Kurve zeigt den Zusammenhang zwischen dem Antikörpertiter und dem am Nullpunkt der Standardkurve gebundenen, prozentualen Anteil der Aktivität an der Gesamtaktivität (B_0/G). Die Kurve wurde unter folgenden Versuchsbedingungen aufgenommen: Gesamtaktivität 5000 cpm, Antiserum 0.5 ml, Gesamtvolumen der Probe 0.9 ml, Inkubationszeit 3 h bei 4° C, Volumen der Kohlelösung 0.2 ml, Kohle-Äquilibrierungszeit 5 min.

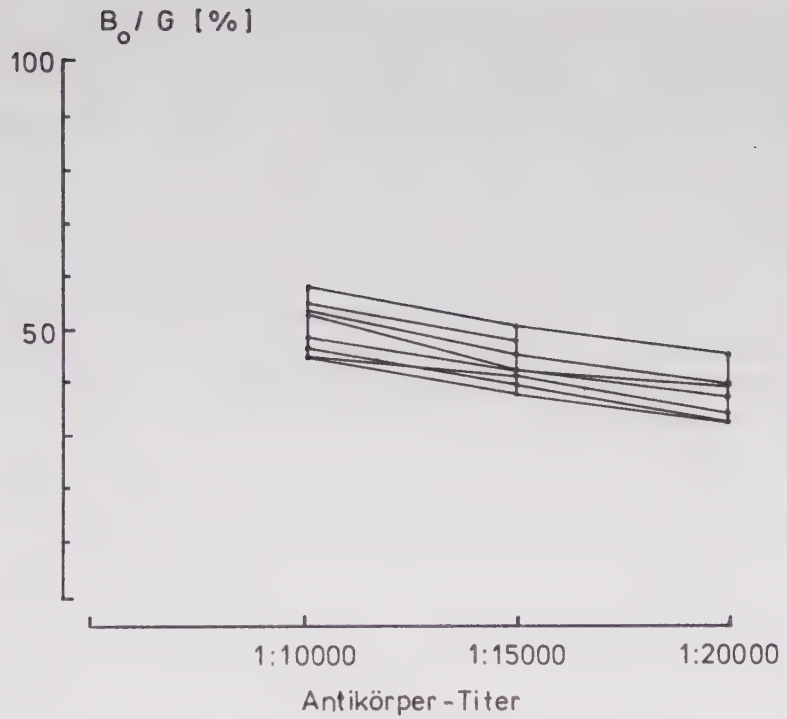


Abb. 7: Der Zusammenhang zwischen Titer und B_o/G wird am Beispiel von acht verschiedenen Radioimmuntests dargestellt (Versuchsbedingungen siehe vorstehende Abbildung). Während der Durchführung des Radioimmuntests wurde für jeden Test eine neue Probe des Antikörpers (0.02 ml) aufgetaut, in den angegebenen Stufen verdünnt und in einem Vorversuch ausgetestet.

4.1.3. Antikörper-Inkubationszeiten

In der Abb. 8 ist der Zusammenhang zwischen der Antikörper-Inkubationszeit einerseits und dem am Nullpunkt der Standardkurve gebundenen prozentualen Anteil der Aktivität an der Gesamtaktivität andererseits dargestellt. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen des eigentlichen Radioimmuntests.

Die Abbildung zeigt, daß eine maximale Bindung schon nach 4 h erreicht war und im weiteren Verlauf der Zeitkurve konstant blieb. In einem anderen, hier nicht dargestellten Versuch zeigte sich, daß schon nach einer Inkubationszeit von 20 min eine ausreichende Bindung vorhanden war, was unter anderem für hohe Bindungsenergieen spricht. Bei der Durchführung der Versuche lag die Inkubationszeit einheitlich bei 3 h.

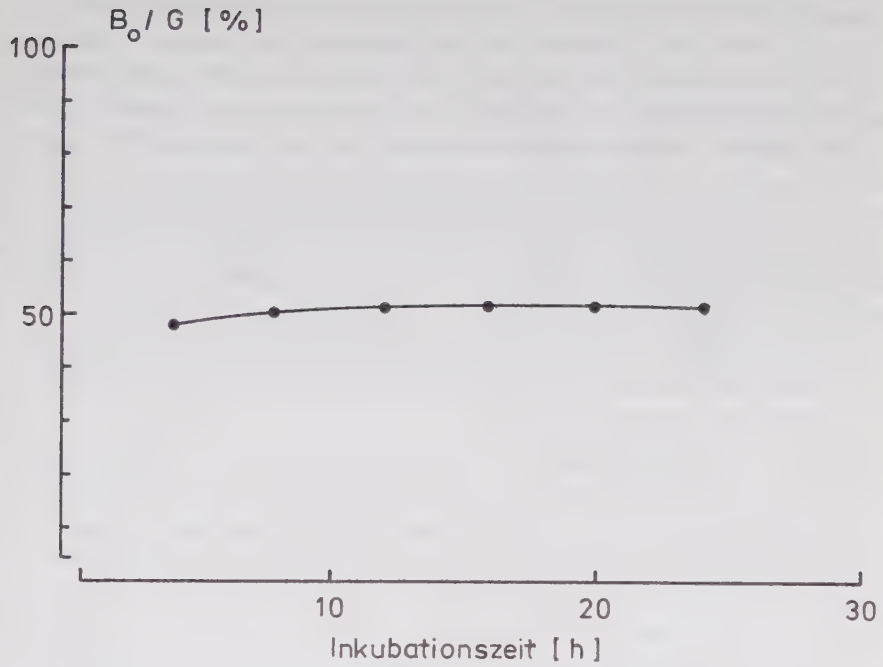


Abb. 8: Dargestellt ist der Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit mit dem Antikörper und dem am Nullpunkt der Standardkurve gebundenen Anteil der Aktivität an der Gesamtaktivität (B_o/G)

4.1.4. Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve

Die Abb. 9 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve des Radioimmuntests als Ergebnis einer Sechsfachbestimmung der einzelnen Standardproben. Dargestellt sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte der Messungen und die 1 s-Bereiche, die gezeigte Kurve wurde grafisch an die Versuchsdaten angepasst. Bei dieser wie bei allen anderen Darstellungen wurde auf der Abszisse die Cortisolkonzentration in logarithmisch transformierter Form und auf der Ordinate die jeweils zugehörige, am Antikörper gebundene Aktivitätsmenge eingetragen. Dabei wurden der jeweils gebundene Anteil der Gesamtaktivität und diejenige Aktivität, die ohne Zusatz von unmarkiertem Hormon am Antikörper gebunden wird (sog. Nullpunkt der Standardkurve), in Beziehung gesetzt und als prozentuales Verhältnis ausgedrückt (B/Bo x 100). Bei unseren Untersuchungen lag der Arbeitsbereich des Radioimmuntests im geraden Teil der Standard- bzw. Dosis-Wirkungskurve.

Die Abb. 10 zeigt die Anpassung von Polynomen erster bis dritter Ordnung an die Meßdaten einer Standardkurve, wobei bei dieser Abbildung die Abszisse nicht logarithmisch transformiert wurde. Die Darstellung zeigt, daß sich bereits mit einem Polynom dritter Ordnung eine befriedigende Anpassung erreichen läßt. Die Abb. 11 zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve nach Durchführung einer Logit-Log-Transformation. Die Logit-Log-Transformation wurde von Rodbard et al. vorgeschlagen, da sich aufgrund des sigmoidalen Verlaufs der Standardkurve durch eine Logit-Transformation der Antwortvariablen (B/B_0) bei einem Auftragen der Kurve gegen die logarithmisch transformierten Konzentrationswerte eine Linearisierung erreichen läßt (75).

Aus $$Y = \frac{B}{B_0} \qquad (1)$$

ergibt sich $$\text{Logit } Y = \ln \frac{Y}{1 - Y} \qquad (2)$$

Wie bereits in der Einleitung angesprochen, haben Rodbard et al. bei der Berechnung der Kurvenparameter mittels Regressionsanalyse für jeden einzelnen Punkt der Standardkurve Wägefaktoren

berücksichtigt (76).

Bei unseren Untersuchungen ergab sich nach Einführung von Wägefaktoren kein wesentlich anderer Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve. Analoge Untersuchungen zur Kurvenanpassung wurden außerdem noch mit kubischen Spline-Funktionen und Probit-Transformationen durchgeführt. Alle Berechnungen wurden mit Fortran-Programmen auf einer IBM/370 - 168 (Betriebssystem OS / VS 2) - Datenverarbeitungsanlage ausgeführt.

Die genannten Untersuchungen wurden durchgeführt um zu prüfen, ob sich bei dem hier benutzten Radioimmuntest unter Zuhilfenahme von Rechenmaschinen genauere Ergebnisse erreichen ließen. Der erforderliche Aufwand, vor allem bei der Datenübertragung, erschien jedoch zu hoch, so daß bei der routinemäßigen Auswertung auf die hier dargestellten Verfahren verzichtet wurde.

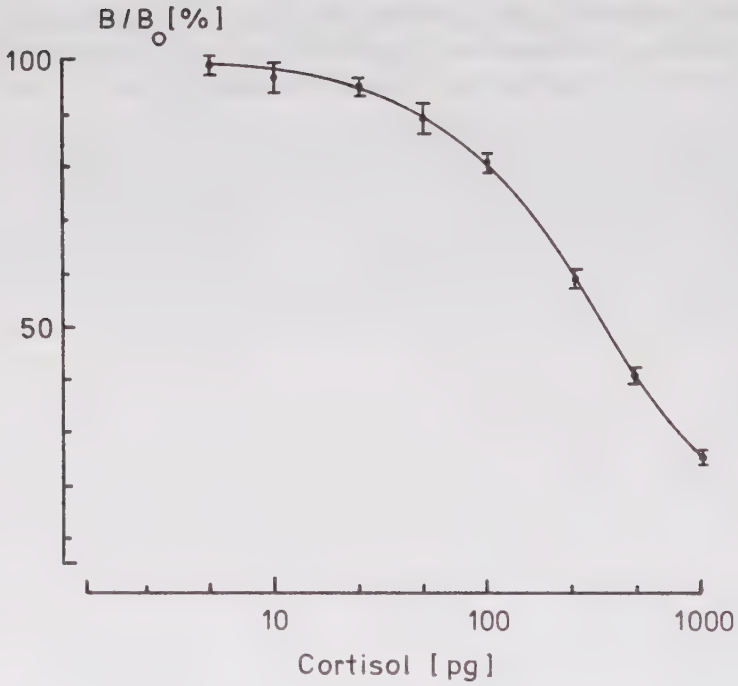


Abb. 9: Dosis-Wirkungs-Kurve des Cortisol-Radioimmuntests. Bei dem vorliegenden Beipiel lagen den einzelnen Meßpunkten der Kurve jeweils Sechsfachbestimmungen der zugehörigen Standardproben zugrunde; dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der Messungen und die 1s-Bereiche.

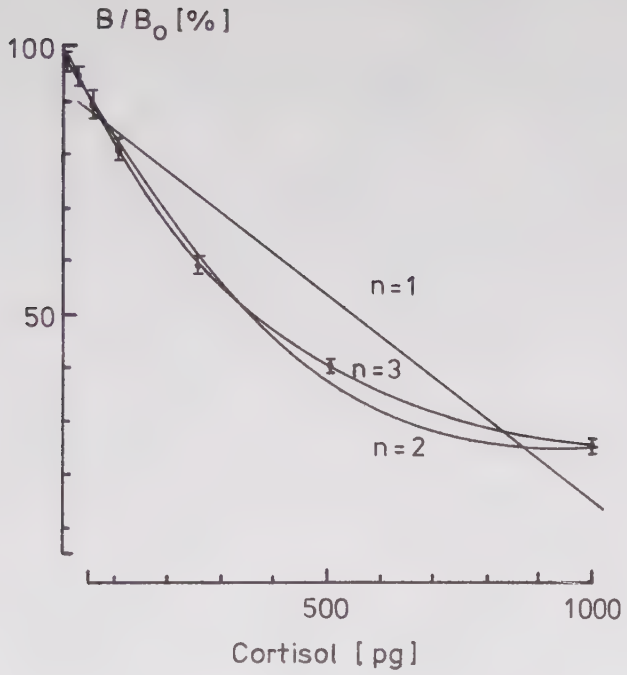


Abb. 10: Anpassung von Polynomen erster bis dritter Ordnung an die Meßpunkte einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Im vorliegenden Beipiel wurde auf die normalerweise benutzte logarithmische Darstellung der Konzentrationswerte (waagerechte Achse) verzichtet.

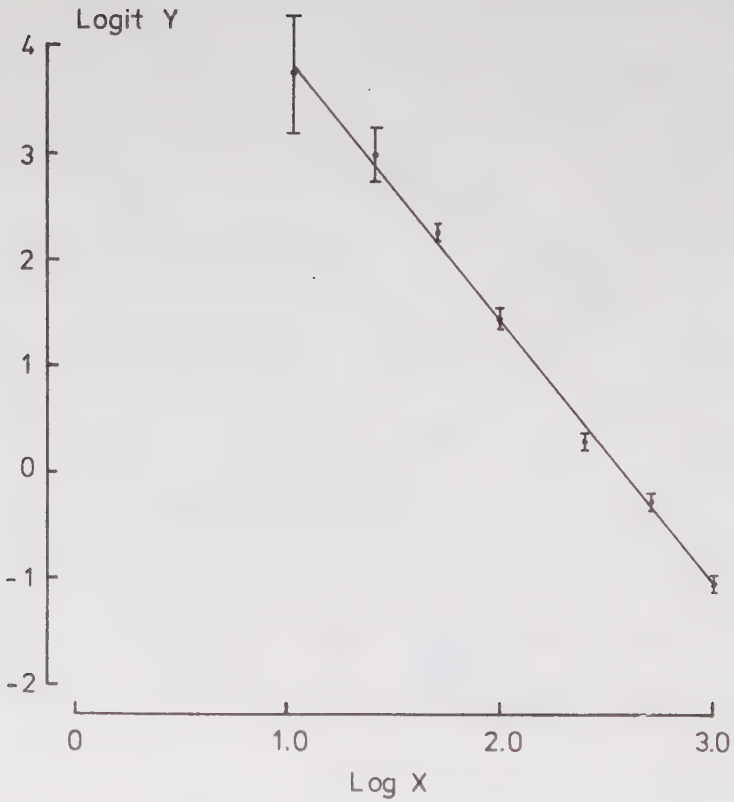


Abb. 11: Dosis-Wirkungs-Kurve nach Logit-Log-Transformation. Nach einer Logit-Transformation der Antwortvariablen B/b_0(Logit Y) und zusätzlicher logarithmischer Transformation der Konzentrationswerte (Log X) läßt sich in den meisten Fällen eine Linearisierung der Dosis-Wirkungs-Kurve erreichen.

4.1.5. Vergleich verschiedener Standardlösungen

Die Richtigkeit eines Radioimmuntests hängt u.a. davon ab, ob die eingewogene Hormonmenge und die Verdünnungsschritte bei der Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve fehlerbehaftet sind und ob damit der tatsächliche Verlauf der Standardkurve dem angenommenen entspricht. Abb. 12 stellt den Verlauf zweier Dosis-Wirkungs-Kurven unter Verwendung einer selbst eingewogenen Standardlösung und einer fertig bezogenen Standardlösung dar.

Die Abbildung zeigt, daß die beiden Kurven untereinander geringgradig verschoben sind. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß es sich hierbei um einen einmaligen Versuch ohne Berücksichtigung von zufälligen Schwankungen handelt. Bei einer 50proz. Bindungsrate entsprechend etwa 258 pg Cortisol beträgt der Unterschied zwischen beiden Kurven ca. 15 pg.

4.1.6. Mehrfache Kontrolle der Dosis-Wirkungs-Kurve innerhalb einer Versuchsserie

Bei größeren Versuchsansätzen konnten die Proben nicht gleichzeitig bearbeitet werden, da der Einfluß von Störgrößen wie z.B. Temperaturschwankungen zu groß wurde und die Aufnahmekapazität von einigen Geräten zu gering war. Es wurden nur jeweils 40 Proben gleichzeitig bearbeitet. Zur Abschätzung von methodischen Schwankungen wurde bei jeder Probenserie ein Teil der Standardkurve erneut bestimmt. Abb. 13 zeigt das Ergebnis einer dreifachen Kontrolle der Standardkurve während eines Versuchsansatzes. Die Abbildung zeigt, daß bei dem herangezogenen Versuchsansatz die drei Dosis-Wirkungs-Kurven kaum voneinander unterschieden werden können, allerdings lagen die Standardkurven nicht immer ähnlich günstig.

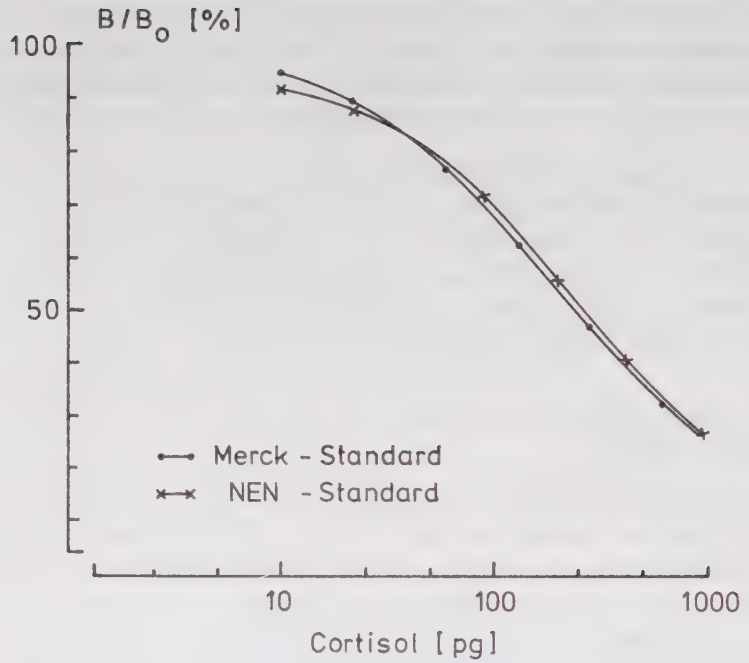


Abb. 12: Verlauf zweier Dosis-Wirkungs-Kurven, die unter Verwendung einer selbst eingewogenen Standardlösung (Merck-Standard) und einer fertig bezogenen Standardlösung erhalten wurden (NEN-Standard). Wie die Abbildung zeigt, stimmen die beiden Standardlösungen hinsichtlich ihrer Cortisolkonzentration weitgehend überein.

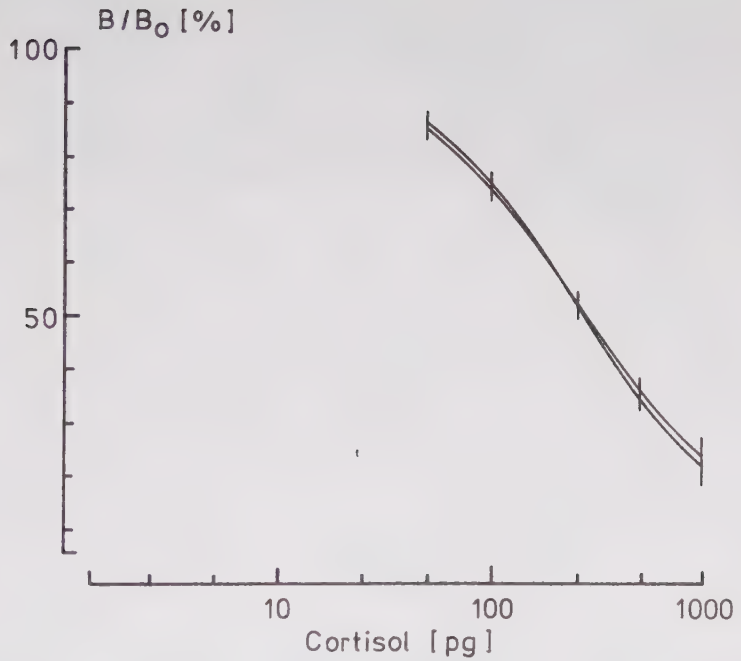


Abb. 13: Verlauf von drei Dosis-Wirkungs-Kurven, die an unterschiedlichen Stellen einer Versuchsserie wiederholt bestimmt wurden. Wie die Abbildung zeigt, stimmen die Kurven in ihrem Verlauf weitgehend überein.

4.1.7. Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bei unterschiedlichen Antikörper-Titern und unterschiedlicher Gesamtaktivität

Abb. 14, 15 und 16 zeigen den Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bei unterschiedlichen Antikörpertitern von 1 : 10 000, 1 : 15 000 und 1 : 20 000 und bei Gesamtaktivitäten von 1 500 cpm, 3 000 cpm und 6 000 cpm. Die Versuche wurden durchgeführt zur Ermittlung der optimalen Konzentrationen von Antikörper und Gesamtaktivität. Bei einem Vergleich der Kurven fällt auf, daß sich mit einem hohen Antikörpertiter ein steilerer Anfangsverlauf der Kurve erzielen läßt, die Empfindlichkeit damit größer ist. Außerdem führt ein höherer Antikörpertiter zu einer Linksverschiebung der Kurve. Der Einfluß von unterschiedlichen Gesamtaktivitäten ist vergleichsweise gering.

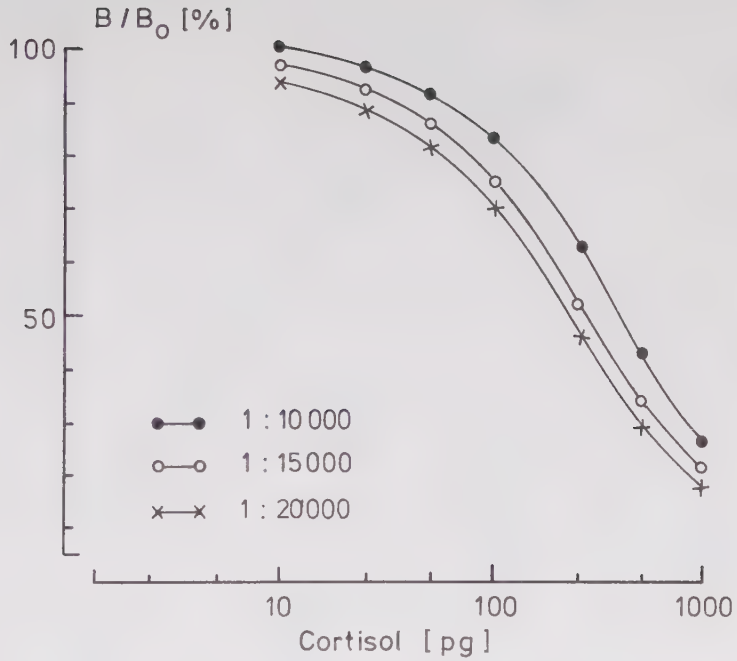


Abb. 14: Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bei unterschiedlichen Antikörpertitern (1 : 10.000, 1 : 15.000 und 1 : 20.000) und einer Gesamtaktivität von 6.000 cpm.

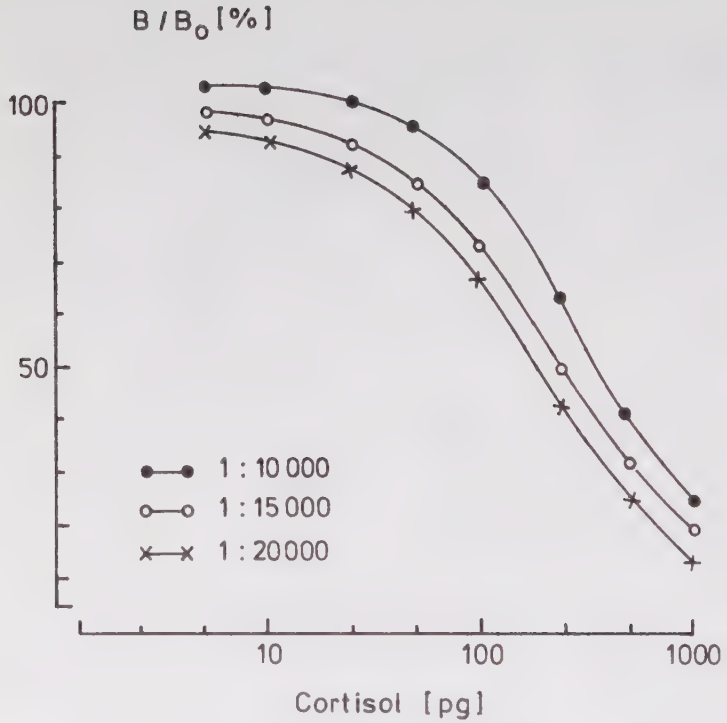


Abb. 15: Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bei unterschiedlichen Antikörpertitern (1 : 10.000, 1: 15.000 und 1 : 20.000) und einer Gesamtaktivität von 3.000 cpm.

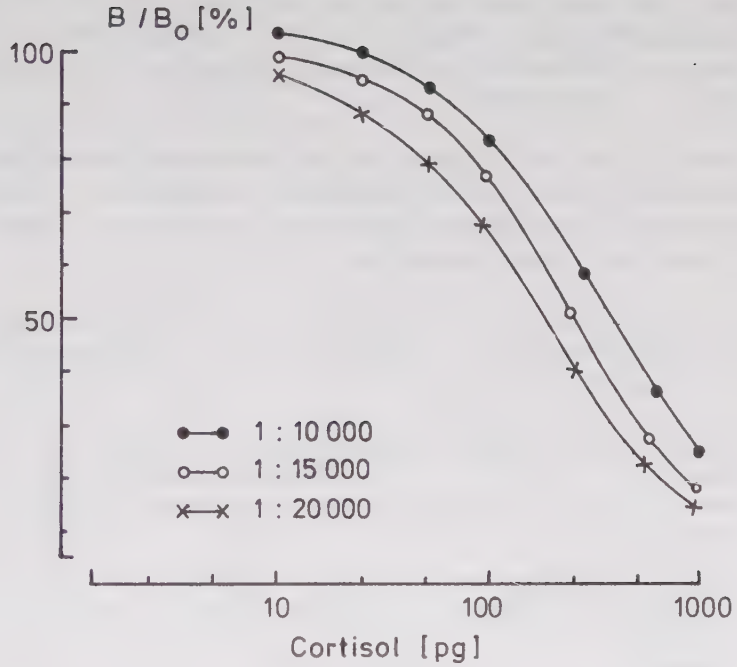


Abb. 16: Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven bei unterschiedlichen Antikörpertitern (1 : 10.000, 1 : 15.000 und 1 : 20.000) und einer Gesamtaktivität von 1.500 cpm.

4.1.8. Kreuzreaktionen des Antikörpers

Die Spezifität eines Radioimmuntests ist hauptsächlich abhängig von den Kreuzreaktionen der verschiedenen Steroide mit dem Antikörper. Die Kreuzreaktionen werden bestimmt durch den Vergleich der unterschiedlichen Mengen an Steroid, die zu einer 50proz. Verdrängung des markierten Cortisols in den Dosis-Wirkungs-Kurven führen.

Die Abb. 17, 18 und 19 zeigen die Dosis-Wirkungs-Kurven von Progesteron, Cortisolsulfat und 6 ß-Hydroxycortisol. Die Kreuzreaktionen von Progesteron beträgt 9 %, von Cortisol-Sulfat ca. 100 % und von 6 ß-Hydroxycortisol ca. 0.1 %.

In der Tab. 1 sind die Kreuzreaktionen von unterschiedlichen Steroiden zusammengefaßt. Auffällig ist die hohe Kreuzreaktion von Cortisolsulfat (100 %).

Steroid	Kreuzreaktion *[%]*
Cortisol	100
Cortisolsulfat	100
11-Desoxycortisol	12
Cortison	10
Progesteron	9
Corticosteron	8
11-Desoxycorticosteron	3
6 ß-Hydroxycortisol	1

Tab. 1: Kreuzreaktionen von verschiedenen Steroidhormonen im Cortisol-Radioimmuntest.

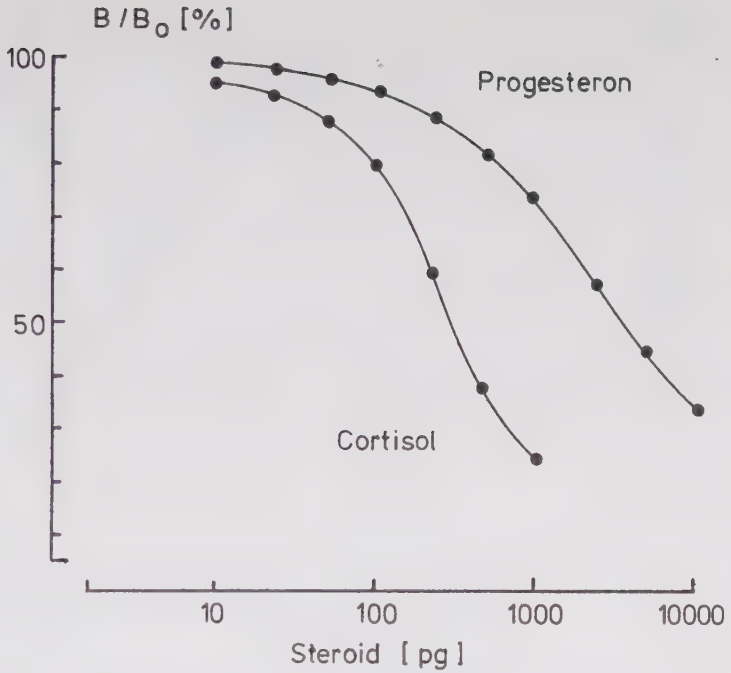


Abb. 17: Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von Cortisol und Progesteron zur Bestimmung der Kreuzreaktion des Progesterons. Berechnet wurde die Kreuzreaktion bei einer 50proz. Verdrängung des markierten Cortisols vom Antikörper, sie beträgt beim Progesteron 9 %.

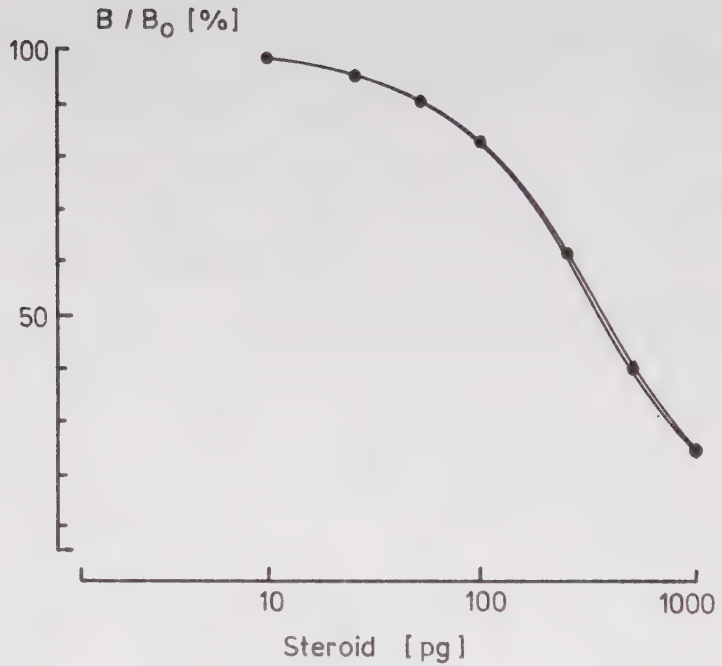


Abb. 18: Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von Cortisol und Cortisolsulfat zur Bestimmung der Kreuzreaktion des Cortisolsulfats. Berechnet wurde die Kreuzreaktion bei einer 50proz. Verdrängung des markierten Cortisols vom Antikörper, sie beträgt beim Cortisolsulfat annähernd 100 %.

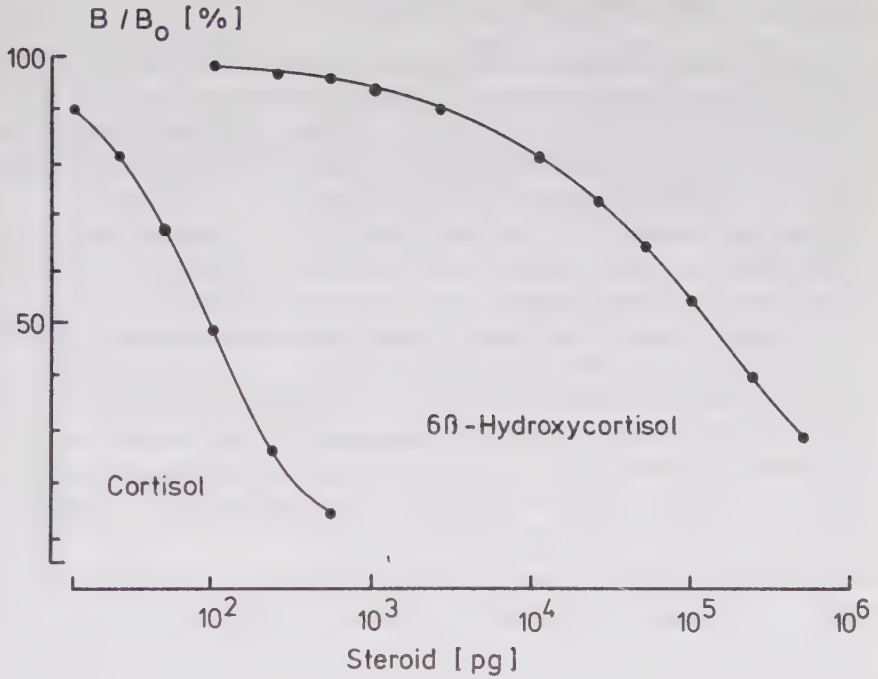


Abb. 19: Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von Cortisol und 6ß-Hydroxycortisol zur Bestimmung der Kreuzreaktion des 6ß-Hydroxycortisols. Berechnet wurde die Kreuzreaktion bei einer 50proz. Verdrängung des markierten Cortisols vom Antikörper, sie beträgt beim 6ß-Hydroxycortisol etwa 0.1 %.

4.2. Ergebnisse der Qualitätskontrolle

4.2.1. Dichlormethan-Extraktion und Äthanol-Fällung

4.2.1.1. Wiederfindung und Richtigkeit

Die Tab. 2 und 3 zeigen, welcher Anteil einer ursprünglich in einem hormonfreien Fruchtwasser gelösten Hormonmenge mit der Dichlormethanmethode und der Äthanolmethode wiedergefunden wurde. Die Versuchsbedingungen entsprachen den üblichen Testbedingungen; zur Herstellung des hormonfreien Fruchtwassers wurde eine Aktivkohle-Trennung in einem Fruchtwasser-Pool durchgeführt. Das hormonfreie Fruchtwasser wurde außerdem als Leerprobe bei allen Radioimmuntests mitbestimmt, die Hormonkonzentration lag bei 0 ng/ml. Die in den Tabellen angeführten Werte sind ein Maß für die Richtigkeit der Bestimmungsmethode. Es wurden jeweils Fünffachkontrollen durchgeführt. Zur Korrektur der Verluste bei der Extraktion bzw. bei der Fällung wurde vor Ausführung des Trennschrittes der Probe markiertes Cortisol zugefügt, der Aktivitätsverlust nach der Extraktion bestimmt und ein Korrekturfaktor berechnet (interner Standard).

Die Ergebnisse zeigen, daß bei der Dichlormethan-Extraktion ohne Korrektur durchschnittlich 87 % und mit Korrektur 100 % des zugefügten Cortisols wiedergefunden wurde. Bei der Äthanol-Fällung lag die Wiederfindung ohne Korrektur bei durchschnittlich 102 % und mit Korrektur bei 109 %.

Eine weitere Kontrolle der Richtigkeit ist durch die Teilnahme an einem Ringversuch gegeben. Der hier dargestellte Radioimmuntest hat im Oktober 1976 an einem solchen Versuch der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie teilgenommen: die Qualitätskriterien wurden dabei erfüllt. Überprüft wurde nur die Äthanolmethode. Außerdem ist zu bemerken, daß sich der Test nur auf die Bestimmung von Cortisol in äthanolischer Lösung und in Serum erstreckte, nicht jedoch auf eine Bestimmung im Fruchtwasser. Durch ein anderes Steroidmuster im Fruchtwasser ist bei den möglichen Kreuzreaktionen des Antikörpers eine Fehlermöglichkeit gegeben.

ÄTHANOL-FÄLLUNG		
Ohne Korrektur	eingesetzt	gefunden ± s
	50 ng	52.5 ± 0.8 ng
	100 ng	94.4 ± 5.1 ng
Mit Korrektur	eingesetzt	gefunden ± s
	50 ng	57.0 ± 0.6 ng
	100 ng	104.0 ± 3.8 ng

DICHLORMETHAN-EXTRAKTION		
Ohne Korrektur	eingesetzt	gefunden ± s
	50 ng	42.9 ± 1.3 ng
	100 ng	89.0 ± 3.4 ng
Mit Korrektur	eingesetzt	gefunden ± s
	50 ng	50.2 ± 1.8 ng
	100 ng	100.7 ± 6.7 ng

Tab. 2 u. 3: Die Tabellen zeigen, welche Anteile von zwei unterschiedlichen Cortisolmengen, die einem ursprünglich hormonfreien Fruchtwasserpool zugesetzt wurden, nach Anwendung der beiden Trennmethoden wiedergefunden wurden. Die Berechnungen wurden jeweils getrennt mit einer Korrektur und ohne eine Korrektur der methodischen Verluste durchgeführt.

SERUMPROBE		
Nr.	gemessener Wert	Sollwert
1	0.32 µmol/l	0.33 ± 0.033 µmol/l
2	0.97 µmol/l	1.08 ± 0.108 µmol/l

ÄTHANOLPROBE		
Nr.	gemessener Wert	Sollwert
1	0.99 µmol/l	1.08 ± 0.108 µmol/l
2	0.26 µmol/l	0.29 ± 0.029 µmol/l

Tab. 4: Ergebnisse eines Ringversuchs der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie zur externen Qualitätskontrolle. Es lagen jeweils zwei Serumproben und zwei Proben in äthanolischer Lösung mit jeweils unterschiedlichen Cortisolkonzentrationen vor. Die Qualitätsanforderungen des Ringversuchs wurden erfüllt.

4.2.1.2. Präzision

In der Tab. 5 sind die Ergebnisse eines Versuchs zur Bestimmung der Präzision in der Serie aufgeführt. Für die Analysen stand ein Pool aus einer größeren Anzahl von Fruchtwasserproben zur Verfügung, es wurden jeweils Zwölffachbestimmungen durchgeführt.

Wie die Tabelle zeigt, betrug der Variationskoeffizient als Maß für die Präzision bei der Äthanol-Fällung ohne Korrektur 2.9 % und mit Korrektur durch einen internen Standard 2.8 %. Bei der Dichlormethan-Extraktion lagen die entsprechenden Werte bei 4.2 % bzw. 4.9 %. Die abgelesenen Werte lagen bei beiden Methoden im geraden Teil der Dosis-Wirkungs-Kurve, der auch bei allen anderen Versuchen als Arbeitsbereich verwendet wurde. Nicht berücksichtigt bliebt bei diesem Versuch, daß die Präzision nicht über dem gesamten Bereich der Standardkurve konstant bleibt.

Zur Errechnung eines mittleren Variationskoeffizienten aus mehreren Doppelbestimmungen mit unterschiedlichem Hormongehalt kann eine von Snedecor angegebene Beziehung herangezogen werden:

$$VK = \frac{\sqrt{\Sigma \left(\left(\frac{a}{b} - 1 \right) \times 100 \right)^2}}{2\,n} \qquad (3)$$

Für weitere Einzelheiten wird auf den entsprechenden Abschnitt der Einleitung verwiesen.

Die Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Versuche zur Ermittlung der Präzision von Tag zu Tag. Dabei standen für die Analysen zwei verschiedene Fruchtwasserproben mit einer unterschiedlichen Cortisolkonzentration zur Verfügung, wobei die aus der Standardkurve abgelesenen Konzentrationswerte noch größtenteils im geraden Teil der Kurve lagen. Die Tabelle zeigt, daß der Variationskoeffizient bei der Dichlormethan-Extraktion bei etwa 10 % und bei der Äthanol-Fällung bei 5.6 % bzw. 7.1 % lag. Fruchwasserproben zur Kontrolle der Präzision von Tag zu Tag wurden bei allen Versuchsreihen routinemäßig mitbestimmt. Bei einem Vergleich der Ergebnisse beider Trennmethoden ist einschränkend zu beachten,

daß die Anzahl der Bestimmungen teilweise nicht übereinstimmt und daß außerdem in verschiedenen Bereichen der Dosis-Wirkungs-Kurve gearbeitet wurde.

ÄTHANOL-FÄLLUNG	
Ohne Korrektur durch einen internen Standard	Mit Korrektur durch einen internen Standard
$\bar{x}$ = 59.7 ng/ml s = 1.7 ng/ml VK = 2.9 % n = 12	$\bar{x}$ = 63.5 ng/ml s = 1.8 ng/ml VK = 2.8 % n = 12

DICHLORMETHAN-EXTRAKTION	
Ohne Korrektur durch einen internen Standard	Mit Korrektur durch einen internen Standard
x = 32.3 ng/ml s = 1.3 ng/ml VK = 4.2 % n = 12	x = 33.6 ng/ml s = 1.7 ng/ml VK = 4.9 % n = 12

Tab. 5: Präzision in der Serie bei der Äthanol-Fällung und der Dichlormethan-Extraktion. Die Berechnungen wurden jeweils getrennt mit einer Korrektur und ohne eine Korrektur der methodischen Hormonverluste mit Hilfe eines radioaktiv markierten internen Standards durchgeführt.

Pool Nr.	Äthanol	Dichlormethan
1	$\bar{x}$ = 239.3 ng/ml s = 16.9 ng/ml VK = 7.1 % n = 11	$\bar{x}$ = 69.8 ng/ml s = 7.1 ng/ml VK = 10 % n = 5
2	$\bar{x}$ = 59.8 ng/ml s = 3.4 ng/ml VK = 5.6 % n = 7	$\bar{x}$ = 30.9 ng/ml s = 2.9 ng/ml VK = 9.5 % n = 7

Tab. 6: Präzision von Tag zu Tag bei der Äthanol-Fällung und der Dichlormethan-Extraktion. Für die Bestimmungen standen zwei Fruchtwasserproben (Pool Nr. 1 und Nr. 2) mit unterschiedlichen Cortisolkonzentrationen zur Verfügung.

4.2.1.3. Vergleich beider Methoden

Die Tab. 7 zeigt die prozentuale Wiederfindung von markiertem Cortisol, das vor Ausführung des entsprechenden Trennschrittes den Fruchtwasserproben zugefügt wurde. Die Resultate zeigen, daß der Verlust bei der Dichlormethan-Extraktion durchschnittlich 8.7 % und bei der Äthanol-Methode 0.6 % betrug. In den meisten Fällen konnte bei der Äthanol-Fällung auf eine rechnerische Korrektur der Ergebnisse mit einem aus der Wiederfindung ermittelten Faktor verzichtet werden. Bei der Dichlormethan-Extraktion wurde mit einem Korrekturfaktor gearbeitet.

Tab. 8 zeigt das Ergebnis einer Fünffachbestimmung einer Wasserleerprobe und eines steroidfreien Fruchtwassers unter Anwendung der obengenannten Trennverfahren. Das steroidfreie Fruchtwasser wurde mittels einer Aktivkohle-Behandlung hergestellt. Die Tabelle zeigt, daß bei der Äthanol-Methode beide Leerwerte bei Null lagen, während bei der Dichlormethan-Methode noch durchschnittlich 1 ng/ml Cortisol gemessen wurde, was am ehesten auf Lösungsmittelverunreinigungen zurückzuführen ist.

Dichlormethan-Extraktion	Äthanol-Methode
$\bar{x}$ = 91.3 %	$\bar{x}$ = 99.4 %
s = ±2.1 %	s = ±4.7 %
VK = 2.3 %	VK = 4.8 %
n = 70	n = 70

Tab. 7: Prozentuale Wiederfindung von radioaktiv markiertem Cortisol, welches vor der Ausführung der beiden Trennmethoden den Fruchtwasserproben zugefügt worden war.

	Äthanol-Methode	Dichlormethan-Methode
Wasser-leerwert	0 ng/ml	1.1 ± 0.7 ng/ml
Fruchtw.-leerwert	0 ng/ml	0.9 ± 0.9 ng/ml

Tab. 8: Ergebnis einer Fünffachbestimmung einer hormonfreien Wasser- bzw. Fruchtwasserprobe mit Hilfe der beiden Trennmethoden.

4.2.2. Säulenchromatografie

Im Rahmen der Untersuchung wurde zur Trennung der verschiedenen Steroide bei 20 Fruchtwasserproben eine Säulenchromatografie durchgeführt. Zur Überprüfung der Trenneigenschaften der Säule wurde das Elutionsdiagramm von 11 verschiedenen Steroiden bestimmt. Das genaue Verfahren wurde bereits im methodischen Teil beschrieben; als Fließsystem wurde ein Gemisch von Cyclohexan, Dichlormethan, Methanol und Wasser in einem Volumenverhältnis von 200 : 160 : 30 : 2 verwendet.

Die Abb. 20 zeigt, daß die Cortisol-Fraktion im wesentlichen nur von der Cortison-Fraktion überlagert wurde. Bei der durchgeführten eingeengten Abtennung des Cortisol-Eluats und der geringen Kreuzreaktion des Antikörpers dürfte das Cortison keinen wesentlichen Einfluß auf die Bestimmungen haben.

In der Tab. 9 ist das Ergebnis der Versuche zur Bestimmung der Präzision in der Serie für die Säulenchromatografie mit anschließendem Radioimmuntest aufgeführt. Der Variationskoeffizient betrug 5.9 %, wobei wegen des methodischen Aufwands nur eine Fünffachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Tab. 10 zeigt die Wiederfindung von markiertem Cortisol, welches vor der Säulenchromatografie den Fruchtwasserproben zugefügt wurde. Die Wiederfindung betrug im Durchschnitt 79.8 %. Wurde das als interner Standard verwendete radioaktive Cortisol vor Durchführung der eigentlichen Chromatografie mittels einer Sephadex-LH 20-Säule gereinigt, so ließ sich die Wiederfindungsrate von 79 % auf 83 % steigern.

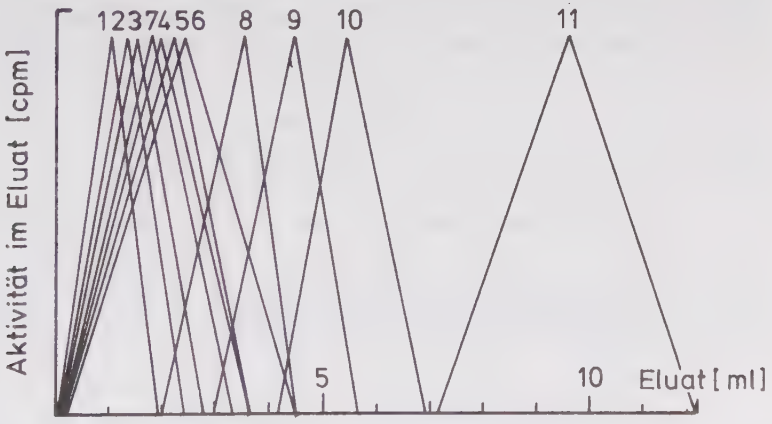


Abb. 20: Elutionsdiagramm von 11 verschiedenen Steroiden an einer Sephadex-LH 20-Säule. Die Zahlen bedeuten im einzelnen: 1 = Progesteron, 2 = Androstendion, 3 = 17α-Hydroxyprogesteron, 4 = Testosteron, 5 = Dehydroepiandrosteron, 6 = 5α-Dihydrotestosteron, 7 = 20α-Dihydroprogesteron, 8 = Corticosteron, 9 = Aldosteron, 10 = Cortison, 11 = Cortisol.

Präzision der Säulenchromatografie	
$\bar{x}$	= 70.7 ng/ml
s	= ±4.2 ng/ml
VK	= 5.9 %
n	= 5

Tab. 9: Präzision in der Serie bei Anwendung der Säulenchromatografie mit anschließendem Radioimmuntest.

Wiederfindung bei Anwendung der Säulenchromatografie	
$\bar{x}$	= 79.8 %
s	= ±10.8 %
VK	= 13 %
n	= 21

Tab. 10: Wiederfindungsrate von radioaktiv markiertem Cortisol nach Durchführung der Säulenchromatografie.

4.2.3. Enzymatische Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie

Zur Bestimmung der Steroidkonjugate wurde in einem anderen Versuch bei den schon genannten 20 Fruchtwasserproben vor der Säulenchromatografie zusätzlich eine enzymatische Hydrolyse durchgeführt. Die Tab. 11 zeigt die Präzision in der Serie der genannten Methode, der Variationskoeffizient lag bei einer Fünffachbestimmung bei 4.9 %.

Zur Überprüfung der Aktivität der Arylsulfatase im Enzympräparat wurde eine Cortisolsulfat-Lösung mit einer Konzentration von etwa 200 ng/ml hergestellt. Eine Probe dieser Lösung wurde zur Herstellung gleicher Ausgangsbedingungen mit Äthanol behandelt. Anschließend wurde die Hormonkonzentration mit unserem Radioimmuntest bestimmt; sie lag bei 219 ng/ml. Die Untersuchung bestätigte gleichzeitig die Vermutung, daß Cortisolsulfat aufgrund seiner hohen Kreuzreaktion nach Durchführung einer Äthanol-Fällung im Radioimmuntest miterfaßt wurde. Zur Überprüfung einer möglichen Zersetzung des Cortisolsulfats wurde die Hormonkonzentration in einer anderen Probe im Anschluß an eine Säulenchromatografie bestimmt. In einem Eluatanteil, der normalerweise das Cortisol enthält, ließ sich diesmal kein Hormon nachweisen. Dieser Versuch ist gleichzeitig ein Hinweis dafür, daß das Cortisol und das Cortisolsulfat nicht gleichzeitig eluiert werden.

Zur Überprüfung der enzymatischen Hydrolyse auf Vollständigkeit wurde eine weitere Probe der Cortisolsulfatlösung 48 h mit 0.05 ml Enzymlösung inkubiert. Anschließend wurde eine Säulenchromatografie durchgeführt und die Cortisolkonzentration mit dem Radioimmuntest bestimmt; sie betrug 206 ng/ml. Damit lag die Wiederfindungsrate bei 94 %, gemessen an der direkt bestimmten Cortisolsulfat-Konzentration. Es ist möglich, daß Fruchtwasser analog zum Urin Hemmstoffe für die Glucuronidase und die Sulfatase enthält, die sich bei Urinbestimmungen durch eine Adsorption der Steroidkonjugate an eine Amberlite XAD-2 Säule nach Bradley ausschalten lassen(83). Ein vergleichbarer Versuch wurde allerdings bei unseren Fruchtwasseranalysen nicht durchgeführt. Nach den Angaben

des Herstellers reicht die Enzymaktivität in 0.05 ml des Präparats (0.23 U) für eine weit höhere als die vorhandene Substratmenge. Die Wiederfindungsrate von markiertem Cortisol, das aus Mangel an radioaktiv markiertem Cortisolsulfat den Proben zugesetzt worden war, betrug nach Durchführung der enzymatischen Hydrolyse und der Säulenchromatografie 83 %.

Präzision der Hydrolyse mit anschl. Säulenchromatografie	
$\bar{x}$	= 169.4 ng/ml
s	= ± 8.2 ng/ml
VK	= 4.9 %
n	= 5

Tab. 11: Präzision in der Serie bei der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie.

4.3. Untersuchungen zum Konzentrationsverlauf von Cortisol und seinen Abbauprodukten im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter

4.3.1. Anwendung der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung als Trennverfahren

4.3.1.1. Ausgewählte Verläufe

Im folgenden zweiten Ergebnisteil werden die Resultate dargestellt, die sich bei der Analyse der Fruchtwasserproben ergaben. Dabei wird zunächst auf die Äthanol-Fällung und die Dichlormethan-Extraktion eingegangen.

Die Abb. 21 bis 28 stellen die Cortisolkonzentrationen in den Fruchtwasserproben von Patientinnen dar, bei denen mehrmals Amniozentesen durchgeführt wurden. Im ganzen sind Verlaufskontrollen von zwölf Patientinnen aufgezeichnet. Dabei sind die Diagramme mit den beiden parallel durchgeführten Trennmethoden jeweils für drei Patientinnen auf einer Seite angeordnet (Äthanol-Fällung oben, Dichlormethan-Extraktion darunter). Auffallend ist, daß die mit der Äthanol-Fällung bestimmten Konzentrationsverläufe in jedem Falle ansteigen, während nach der Dichlormethan-Extraktion nur in sechs Fällen ein sicherer Anstieg nachzuweisen ist. Bei der Äthanol-Fällung ist im Beobachtungszeitraum entweder ein kontinuierlicher Anstieg (Pat. 4 und 9) oder in der Mehrzahl der Fälle ein sprunghafter Konzentrationsanstieg zwischen der 33. und 36. Schwangerschaftswoche zu beobachten. Bei einer der beiden Patientinnen mit einem kontinuierlich ansteigenden Cortisolspiegel (Pat. 9) war der Schwangerschaftsverlauf bis auf eine leichte Rh-Inkompatibilität unauffällig. Bei der Pat. 4 wurde das Kind mit Zeichen der Unreife geboren.

Weiterhin fiel bei den Patientinnen 5, 6, 7, 8 und 12 ein vorübergehender Abfall der Cortisolkonzentration bei der Äthanol-Fällung auf, der etwa in der 30. bis 32. SSW auftrat und damit vor dem schon erwähnten deutlichen Anstieg der Cortisolkonzentration lag.

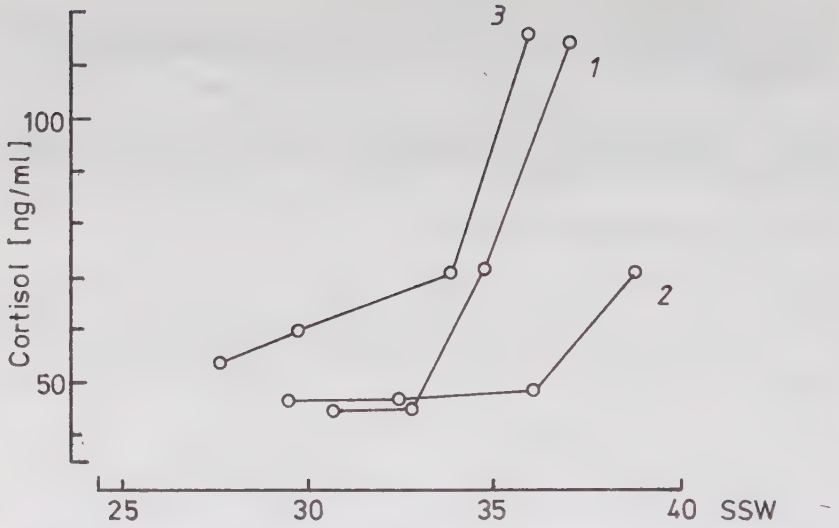


Abb. 21: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40. SSW bei den Pat. 1 - 3 nach Durchführung einer Äthanol-Fällung.

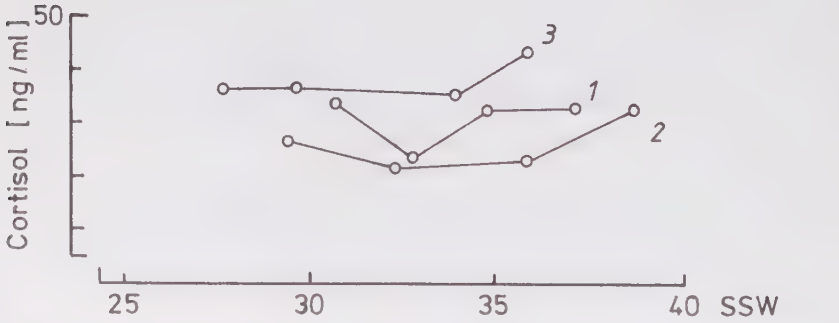


Abb. 22: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40. SSW bei den Pat. 1 - 3 nach Durchführung einer Dichlormethan-Extraktion.

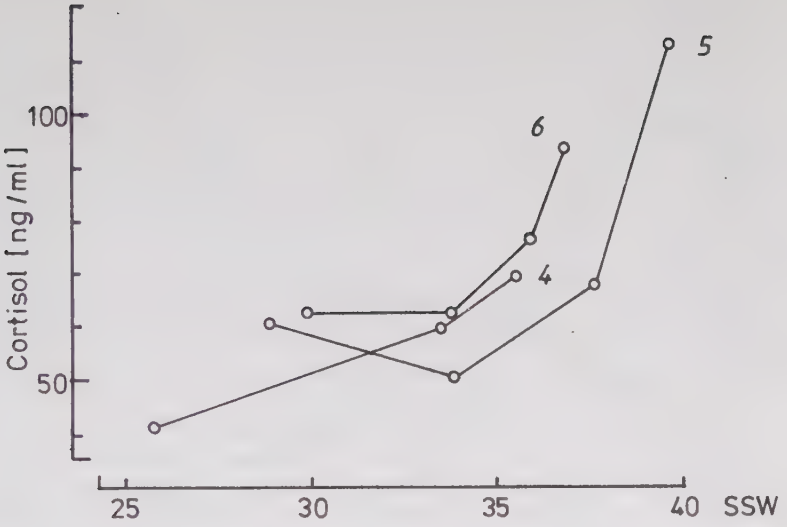


Abb. 23: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40. SSW bei den Pat. 4 - 6 nach Durchführung einer Äthanol-Fällung.

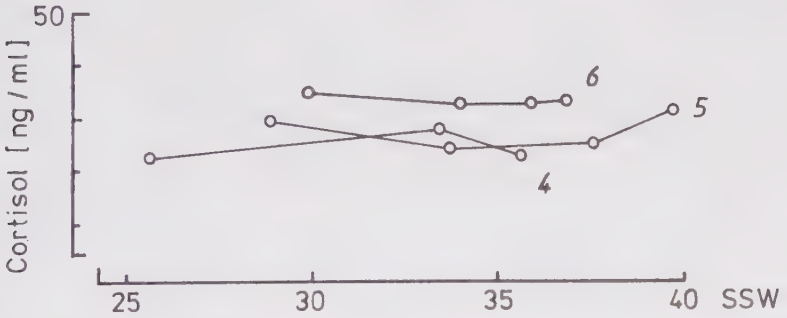


Abb. 24: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40. SSW bei den Pat. 4 - 6 nach Durchführung einer Dichlormethan-Extraktion.

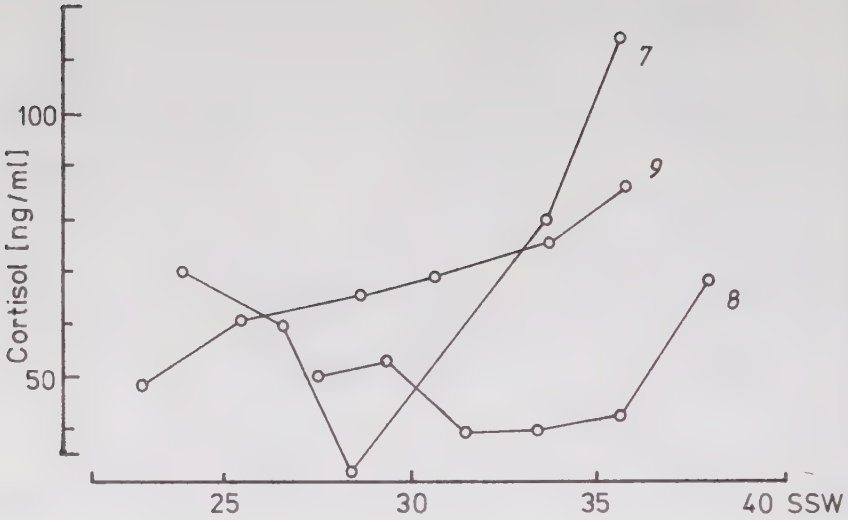


Abb. 25: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40. SSW bei den Pat. 7 - 9 nach Durchführung einer Äthanol-Fällung.

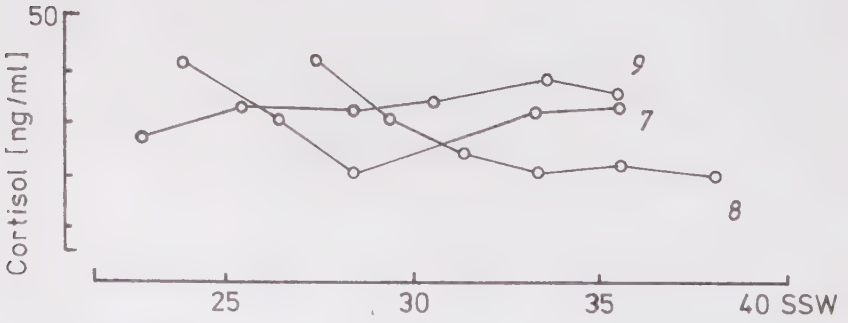


Abb. 26: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40 SSW bei den Pat. 7 - 9 nach Durchführung einer Dichlormethan-Extraktion.

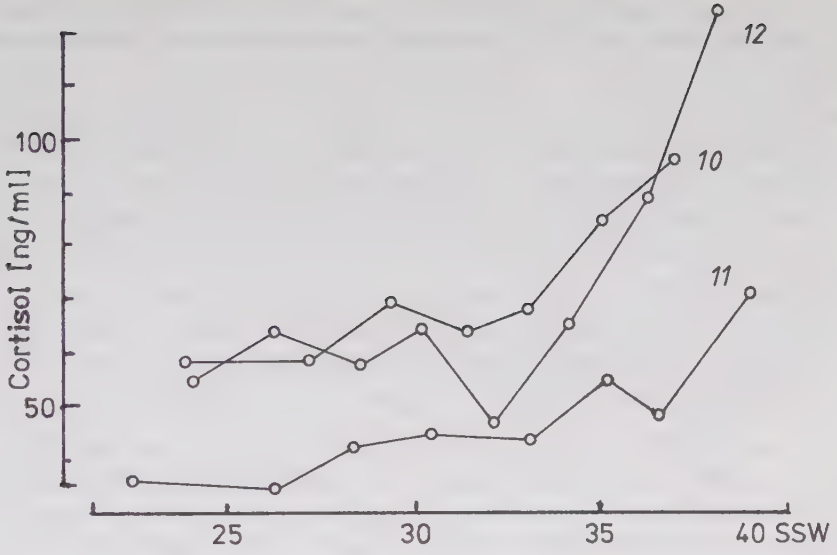


Abb. 27: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40. SSW bei den Pat. 10 - 12 nach Durchführung einer Äthanol-Fällung.

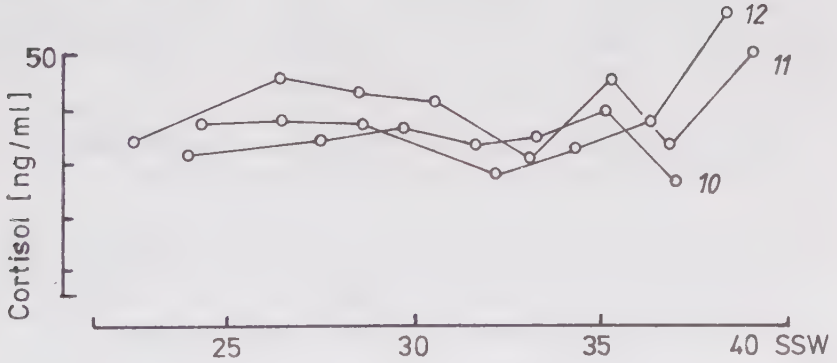


Abb. 28: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von der 25. - 40. SSW bei den Pat. 10 - 12 nach Durchführung einer Dichlormethan-Extraktion.

Bei der Dichlormethan-Extraktion lagen die entsprechenden Meßwerte in der Mehrzahl der Fälle deutlich niedriger als bei der Äthanol-Fällung.

Bei den Fällen 2, 3, 7, 11 und 12 waren die Konzentrationsanstiege bei der Äthanol-Fällung von einem gleichzeitigen Anstieg der Meßwerte gefolgt, die mit der Methylenchlorid-Extraktion ermittelt wurden. Dabei stiegen die Konzentrationen bei der Äthanol-Fällung um deutlich höhere Beträge an. Auch der relative Anstieg (bezogen auf den dem Anstieg vorausgehenden Konzentrationswert) fiel bei der Äthanol-Fällung außer bei zwei Fällen (Pat. 2 und 11) deutlich höher aus. Die Schwankungen im Konzentrationsverlauf verliefen bei beiden Methoden parallel ohne zeitliche Verschiebungen.

Bei den Fällen 4, 8, 9, 10 war gleichzeitig mit einem deutlichen Anstieg der mittels einer Äthanol-Fällung bestimmten Cortisol-Konzentrationen ein Abfall der zugehörigen mit der Dichlormethan-Extraktion bestimmten Cortisol-Konzentration festzustellen. Der Zeitpunkt dieses unterschiedlichen Konzentrationsverlaufs lag etwa in der 34. bis 35. Schwangerschaftswoche. Dabei zeigten nur die Patientinnen 4 und 10 einen auffälligen Schwangerschaftsverlauf.

Bei den Verläufen 1 und 6 blieben die Konzentrationen nach der 34. Schwangerschaftswoche konstant. Außer einer Rh-Inkompatibilität waren hier keine Auffälligkeiten nachzuweisen.

4.3.1.2. Mittlere Cortisolkonzentrationen im Fruchtwasser in verschiedenen Zeitabschnitten der Spätschwangerschaft

Die Tab. 12 zeigt die mittleren Cortisolkonzentrationen im Fruchtwasser von 25 Patientinnen mit den zugehörigen 1s-Bereichen nach Durchführung einer Äthanol-Fällung. Die Tab. 13 enthält die entsprechenden Konzentrationswerte nach Anwendung einer Dichlormethan-Extraktion.

Da nach Sachs die Konzentrationen vieler biochemischer Laborparameter besonders bei Bestimmungen in einem weiten Konzentrationsbereich (über mehrere Zehnerpotenzen) einer logarithmischen Normalverteilung folgt (87), wurde auch bei unseren Untersuchungen für die

Berechnung der statistischen Kennzahlen eine logarithmische Normalverteilung der Meßwerte zugrundegelegt. In Übereinstimmung mit dieser Annahme war mehrfach zu beobachten, daß die 2s-Bereiche der mittleren Cortisolkonzentrationen in verschiedenen Zeitabschnitten ohne Durchführung einer logarithmischen Transformation den Nullwert unterschritten. Eine genaue Prüfung auf das Vorliegen einer logarithmischen Normalverteilung war wegen der geringen Größe des Kollektivs nicht möglich.

Der Untersuchungszeitraum von der 27. bis zur 41. Schwangerschaftswoche wurde in fünf gleichlange Abschnitte unterteilt. Lagen bei einer Patientin aufgrund einer Verlaufsstudie mehrere Meßwerte in verschiedenen Zeitabschnitten vor, so wurden diese Werte bei der Tab. 12 vollständig berücksichtigt. Dabei waren die Patientinnen in jedem der fünf Zeitabschnitte jeweils mit höchstens einem Konzentrationswert vertreten. Eine solche Tabelle darf wegen der Forderung nach Zufälligkeit und Unabhängigkeit der Stichproben nur zur Überprüfung einer Einzelbestimmung und nicht zur Überprüfung eines Verlaufs verwendet werden.

Bei der Tab. 14 wurde im Falle eines Verlaufs mit mehreren Konzentrationswerten jeweils ein einziger Wert nach einem Zufallsplan ausgewählt und im jeweils zugehörigen Zeitabschnitt berücksichtigt. Damit kann die Tabelle zur Beurteilung eines Verlaufs herangezogen werden. Die Tab. 15 zeigt die entsprechenden Werte nach Anwendung einer Dichlormethan-Extraktion. Diese Tabellen wurden zur grafischen Darstellung des Verlaufs der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser herangezogen. Die Abb. 29 und Abb. 30 zeigen die mittleren Cortisolkonzentrationen in Abhängigkeit von der jeweiligen Schwangerschaftswoche nach Durchführung einer Äthanol-Fällung. Dabei wurden in der Abb. 30 zusätzlich einige Konzentrationsverläufe von auffälligen Schwangerschaften aufgeführt. Erkennbar sind der deutliche Anstieg der Cortisolkonzentration in der 36. bis 38. Schwangerschaftswoche und der vorübergehende Konzentrationsabfall in der 30. bis 32. Woche. Die Abb. 31 und 32 zeigen die entsprechenden, nach Anwendung einer Dichlormethan-Extraktion erhaltenen Kurvenverläufe.

Die dargestellten Zahlen bezeichnen Patientinnen mit folgenden Auffälligkeiten während der Schwangerschaft:

1. Intrauteriner Fruchttod bei Hydrops universalis wegen schwerer Rh-Inkompatibilität, Amniozentese drei Tage vor dem vermutlichen Absterben.

2. Intrauteriner Fruchttod bei schwerer Rh-Inkompatibilität, Amniozentese drei Tage nach dem vermutlichen Absterben.

3. Spätabort, Ramifikationsarrest der Plazenta, multiple Mißbildungen beim Kind.

4. Rh-Inkompatibilität mit Ikterus gravis beim Kind. Zusätzlich Gestose bei der Mutter.

5. Rh-Inkompatibilität, zweimalige Gabe von Bethametason in der 27. Schwangerschaftswoche.

6. Hydramnion, Kind bei der Geburt asphyktisch.

7. Rh-Inkompatibilität, Bethametasongabe in der 32. Woche, Kind bei der Geburt mit Ikterus gravis.

8. Rh-Inkompatibilität, Kind bei der Geburt mit Zeichen der Unreife.

9. Rh-Inkompatibilität, Kind bei der Geburt asphyktisch.

10. Hydramnion, Herzfehler beim Kind.

SSW	$\bar{x}$ [ng/ml]	1s-Bereich [ng/ml]	n
27. - 29.	58.7	51.7 - 66.7	11
30. - 32.	54.5	43.2 - 68.7	9
33. - 35.	67.5	51.0 - 89.4	15
36. - 38.	107.1	72.1 - 159.1	12
39. - 41.	243.7	155.2 - 382.6	5

Tabelle 12: Dargestellt sind die mittleren Cortisolkonzentrationen, der 1s-Bereich und die Anzahl der Versuchspersonen für einzelne Zeitabschnitte in der Spätschwangerschaft (Äthanol-Fällung).

SSW	$\bar{x}$ [ng/ml]	1s-Bereich [ng/ml]	n
27. - 29.	33.4	29.3 - 37.9	11
30. - 32.	31.2	25.7 - 37.9	9
33. - 35.	30.9	23.4 - 40.8	15
36. - 38.	34.7	25.9 - 46.5	12
39. - 41.	57.8	41.2 - 81.0	5

Tabelle 13: Dargestellt sind die mittleren Cortisolkonzentrationen, der 1s-Bereich und die Anzahl der Versuchspersonen für einzelne Zeitabschnitte in der Spätschwangerschaft (Dichlormethan-Extraktion).

SSW	$\bar{x}$ [ng/ml]	1s-Bereich [ng/ml]	n
27. - 29.	61.5	49.0 - 77.2	6
30. - 32.	53.9	42.6 - 68.1	5
33. - 35.	66.9	49.8 - 89.9	7
36. - 38.	113.2	75.5 - 169.8	6
39. - 41.	238.6	158.9 - 358.4	6

Tabelle 14: Dargestellt sind die mittleren Cortisolkonzentrationen, der 1s-Bereich und die Anzahl der Versuchspersonen für einzelne Zeitabschnitte in der Spätschwangerschaft. Lagen bei den Versuchspersonen aufgrund von Verlaufskontrollen mehrere Konzentrationswerte vor, so wurde jeweils nur ein Wert berücksichtigt, der nach einem Zufallsplan ausgewählt wurde (Äthanol-Fällung).

SSW	$\bar{x}$ [ng/ml]	1s-Bereich [ng/ml]	n
27. - 29.	37	30.7 - 44.6	6
30. - 32.	32.4	28.7 - 36.6	5
33. - 35.	30.3	18.7 - 49.1	7
36. - 38.	37	30.2 - 45.4	6
39. - 41.	59.5	43.6 - 81.2	6

Tabelle 15: Dargestellt sind die mittleren Cortisolkonzentrationen, der 1s-Bereich und die Anzahl der Versuchspersonen für einzelne Zeitabschnitte in der Spätschwangerschaft. Lagen bei den Versuchspersonen aufgrund von Verlaufskontrollen mehrere Konzentrationswerte vor, so wurde jeweils nur ein Wert berücksichtigt, der nach einem Zufallsplan ausgewählt wurde (Dichlormethan-Extraktion).

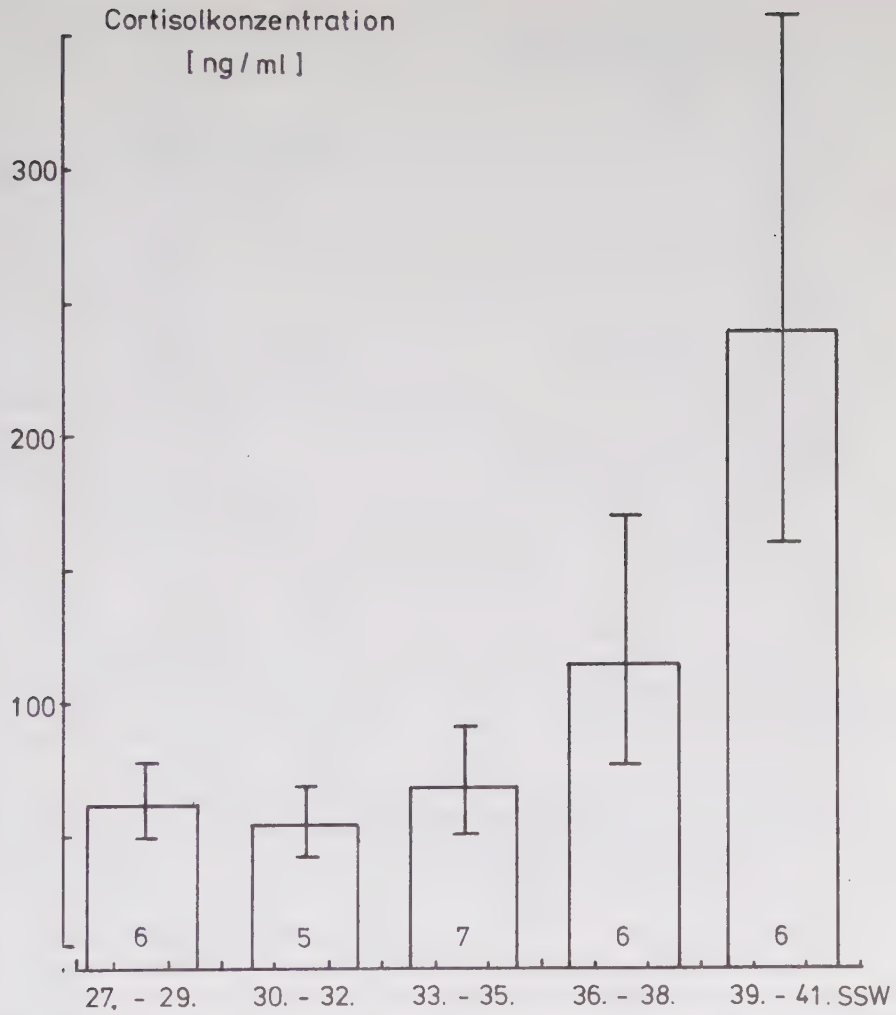


Abb. 29: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit von Gestationsalter nach Durchführung einer Äthanol-Fällung. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte für die angegebenen Zeitabschnitte, die zugehörigen 1s-Bereiche sowie die Anzahl der Versuchspersonen.

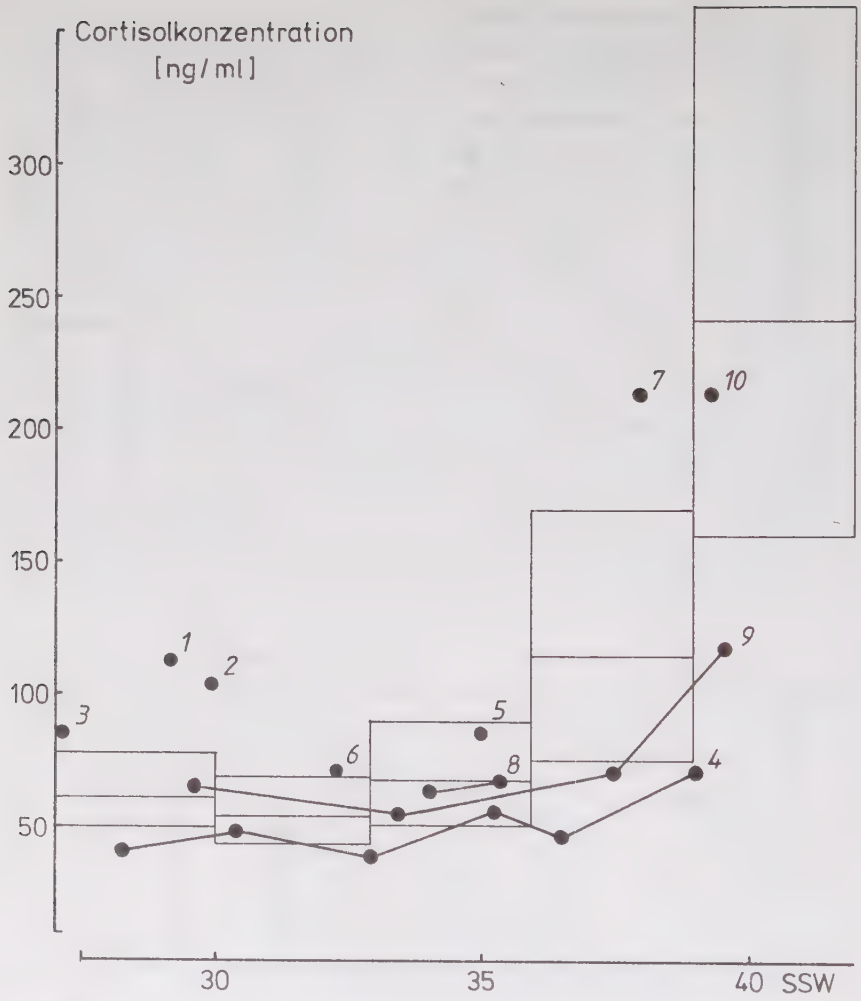


Abb. 30: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter nach Anwendung einer Äthanol-Fällung. Zusätzlich sind Einzelwerte bzw. Konzentrationsverläufe von zehn Patientinnen eingezeichnet, bei denen im Verlauf der Schwangerschaft eine Komplikation auftrat (s. S. 86).

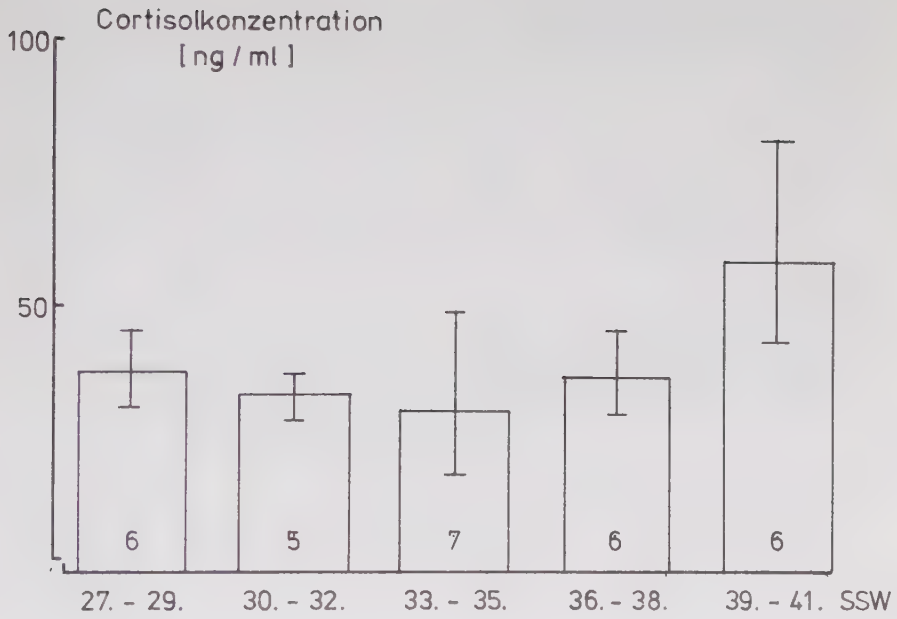


Abb. 31: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter nach Anwendung einer Dichlormethan-Extraktion. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte für die einzelnen Zeitabschnitte und die 1s-Bereiche.

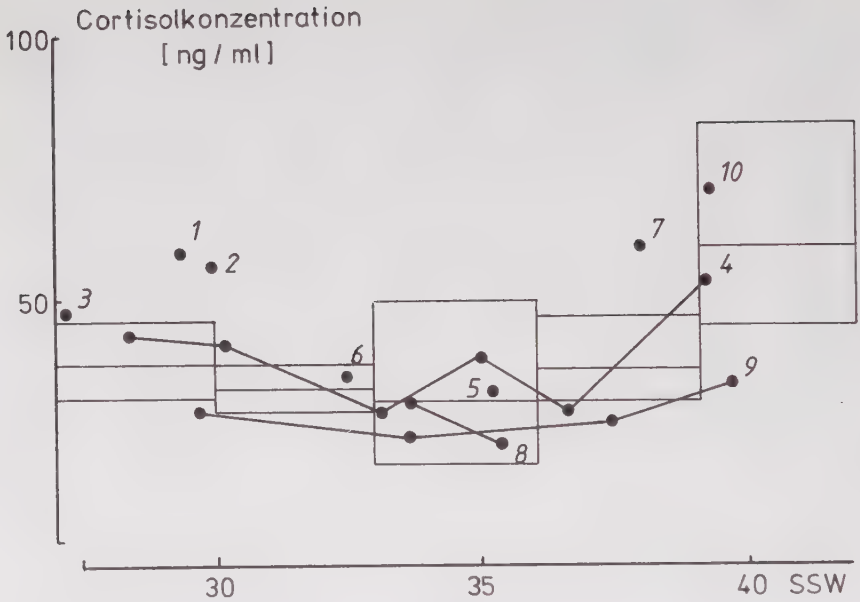


Abb. 32: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter nach Anwendung einer Dichlormethan-Extraktion. Zusätzlich sind Einzelwerte bzw. Konzentrationsverläufe von zehn Patientinnen eingezeichnet, bei denen im Verlauf der Schwangerschaft eine Komplikation auftrat (s. S. 86).

4.3.1.3. Varianzanalytischer Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen der verschiedenen Zeitabschnitte

Die einfache Varianzanalyse ist eine statistische Methode, die es gestattet, eine beliebige Anzahl von Mittelwerten miteinander zu vergleichen. Bei der vorliegenden Untersuchung läßt sich mit dieser Methode entscheiden, ob zwischen den mittleren Cortisolkonzentrationen der verschiedenen Zeitabschnitte in der Spätschwangerschaft ein Unterschied besteht. Bei einem signifikanten Ergebnis der Varianzanalyse läßt sich mit weiteren, noch näher dargestellten Testverfahren prüfen, welche Gruppen mit den zugehörigen Mittelwerten sich voneinander unterscheiden.

Die Tab. 16 zeigt das Ergebnis einer einfachen Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen den fünf Zeitabschnitten für die Äthanol-Fällung. Bei der einfachen Varianzanalyse wird die Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) der Stichprobenwerte um das Gesamtmittel in zwei Anteile zerlegt: erstens in die Summe der Abweichungsquadrate der Einzelwerte um die Gruppenmittelwerte (SAQ innerhalb der Gruppen) und zweitens in die Summe der Abweichungsquadrate der Gruppenmittelwerte um das Gesamtmittel (SAQ zwischen den Gruppen). Nach der Berechnung der Quotienten aus den beiden SAQ und den zugehörigen Freiheitsgraden (FG) ergeben sich die mittleren Quadrate (MQ zwischen den Gruppen; MQ innerhalb der Gruppen) und es wird folgende Prüfgröße ermittelt:

$$F = \frac{\text{MQ zwischen den Gruppen}}{\text{MQ innerhalb der Gruppen}}$$

Die Nullhypothese (alle Mittelwerte sind gleich) wird abgelehnt, wenn die Prüfgröße F einen durch $v_1 = k - 1$, $v_2 = n - k$ und α festgelegten kritischen Wert der F-Verteilung überschreitet, wobei k die Anzahl der Gruppen, n die Anzahl der Stichprobenelemente und α die Irrtumswahrscheinlichkeit bedeutet, mit der eine gültige Nullhypothese fälschlich abgelehnt wird. Bei unseren Versuchen betrug α 5%. Da die Varianzanalyse Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen voraussetzt, wurden unsere Versuchsdaten vor Durchführung der Analyse wegen der angenommenen logarithmischen Normalverteilung entsprechend transformiert und anschließend ein Test zur Prüfung

auf Gleichheit (Homogenität) der Varianzen durchgeführt. Näheres zur Varianzanalyse bei Sachs (88).

Im vorliegenden Fall überschreitet der errechnete Prüfwert von 20.798 (Tab. 16, letzte Spalte) den tabellierten F-Wert von 2.76 deutlich, so daß die Nullhypothese (die mittleren Cortisolkonzentrationen in den einzelnen Zeitabschnitten sind gleich) abzulehnen ist. In der Tab. 17 ist das Ergebnis einer Varianzanalyse für die Dichlormethan-Extraktion dargestellt. Auch hier liegt der errechnete Prüfwert von 6.271 über dem tabellierten F-Wert von 2.76, so daß die Nullhypothese ebenfalls abzulehnen ist.

Bei einem signifikanten Ergebnis der Varianzanalyse läßt sich mit weiteren Testverfahren prüfen, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Bei unseren Untersuchungen wurde der Test nach Scheffe angewendet, eine Darstellung des Tests findet sich bei Sachs (88). Die Tab. 18 zeigt in der letzten Spalte das Ergebnis dieses Tests für die Äthanol-Fällung. Dabei sind in dieser Spalte bei den jeweiligen Zeitabschnitten die Nummern der Abschnitte aufgeführt, deren mittlere Cortisolkonzentrationen sich von dem Mittelwert des betreffenden Abschnitts unterscheiden. Wegen der besseren Übersichtlichkeit ist in der Tabelle bei einem Unterschied zwischen zwei Zeitabschnitten nur der jeweils spätere Abschnitt gekennzeichnet. Zusätzlich sind für jeden Zeitabschnitt die Anzahl der Versuchspersonen, die mittleren Cortisolkonzentrationen und die 95%-Vertrauensbereiche für die Mittelwerte aufgeführt. Unter dem Vertrauensbereich des Mittelwertes versteht man ein Intervall, das den Mittelwert der Grundgesamtheit mit der jeweils angegebenen Wahrscheinlichkeit enthält. Die Tab. 18 zeigt, daß sich erst die mittleren Cortisolkonzentrationen der 36. - 38. und der 39. - 41. Schwangerschaftswoche signifikant von den vorhergehenden Zeitabschnitten unterscheiden. Die Tab. 19 enthält die entsprechenden Werte für die Dichlormethan-Extraktion. Im Vergleich zur Äthanol-Fällung unterscheidet sich hier erst die mittlere Cortisolkonzentration der 39. - 41 Schwangerschaftswoche von den Mittelwerten der 30. - 32. und der 33. - 35. Schwangerschaftswoche. Eine Diskussion der Ergebnisse erfolgt in einem späteren Abschnitt.

Variations-ursache	FG	SAQ	MAQ	F
Zwischen den Gruppen	4	1.6630	0.4157	20.798
Innerhalb der Gruppen	25	0.4997	0.0200	
Gesamt-Variation	29	2.1627		

Tab. 16: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen den fünf Zeitabschnitten von der 27. - 41. SSW im Fall der Äthanol-Fällung. Die errechnete Prüfgröße F (letzte Spalte) von 20.798 überschreitet den durch die Testbedingungen festgelegten Tabellenwert von 2.76, damit sind die mittleren Cortisolkonzentrationen von mindestens zwei Zeitabschnitten voneinander verschieden.

Variations-ursache	FG	SAQ	MAQ	F
Zwischen den Gruppen	4	0.3521	0.0880	6.271
Innerhalb der Gruppen	25	0.3509	0.0140	
Gesamt-Variation	29	0.7031		

Tab. 17: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen den fünf Zeitabschnitten von der 27. - 41. SSW im Fall der Dichlormethan-Extraktion. Auch hier liegt der F-Wert von 6.271 über dem tabellierten F-Wert von 2.76.

Nr.	SSW	n	$\bar{x}$ [ng/ml]	95%-VB für $\bar{x}$ [ng/ml]	Es besteht ein sign.Unterschied zur Gruppe mit der Nr.:
1	27. - 29.	6	61.5	48.5 - 78.1	-
2	30. - 32.	5	53.9	40.3 - 72.	-
3	33. - 35.	7	66.9	50.9 - 88.	-
4	36. - 38.	6	113.2	74. - 173.2	1, 2, 3
5	39. - 41.	6	238.6	155.7 - 365.7	1, 2, 3, 4

Tab. 18: Schematische Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen für die jeweils aufgeführten Zeitabschnitte von der 27. - 41. SSW nach Anwendung der Äthanol-Fällung. Bei einem signifikanten Ergebnis der Varianzanalyse läßt sich mit einem weiteren Testverfahren (Test nach Scheffe) prüfen, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse dieses Tests sind in der letzten Spalte der Tabelle aufgeführt. Dabei sind bei den jeweiligen Zeitabschnitten die Nummern derjenigen Abschnitte genannt, deren mittlere Cortisolkonzentrationen sich von dem Mittelwert des betreffenden Abschnitts unterscheiden. Wegen der besseren Übersichtlichkeit ist bei einem Unterschied zwischen zwei Mittelwerten nur der spätere Zeitabschnitt gekennzeichnet.

Nr.	SSW	n	$\bar{x}$ [ng/ml]	95%-VB für $\bar{x}$ [ng/ml]	Es besteht ein sign. Unterschied zur Gruppe mit der Nr.:
1	27. - 29.	6	37.	30.5 - 45.	-
2	30. - 32.	5	32.4	27.9 - 37.7	-
3	33. - 35.	7	28.9	20. - 41.6	-
4	36. - 38.	6	37.	29.9 - 45.8	-
5	39. - 41.	6	59.5	42.9 - 82.5	2, 3

Tab. 19: Schematische Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen für die jeweils aufgeführten Zeitabschnitte von der 27. - 41. SSW nach Anwendung der Dichlormethan-Extraktion. Bei dem signifikanten Ergebnis der Varianzanalyse läßt sich mit einem weiteren Testverfahren (Test nach Scheffe) prüfen, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse dieses Tests sind in der letzten Spalte der Tabelle aufgeführt. Dabei sind bei den jeweiligen Zeitabschnitten die Nummern derjenigen Abschnitte genannt, deren mittlere Cortisolkonzentrationen sich von dem Mittelwert des betreffenden Abschnitts unterscheiden. Wegen der besseren Übersichtlichkeit ist bei einem Unterschied zwischen zwei Mittelwerten nur der spätere Zeitabschnitt gekennzeichnet.

4.3.1.4. Darstellung der Beziehung zwischen der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung

In der Abb. 33 ist anhand eines Punktediagramms die Beziehung zwischen der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung dargestellt. Weiterhin ist die errechnete Regressionsgerade eingezeichnet; die zugehörige Regressionsgleichung ist in der Abbildungslegende aufgeführt. Im vorliegenden Fall wurde die nach Anwendung der Äthanol-Fällung gemessene Konzentration als unabhängige Variable x und die entsprechende, nach Anwendung der Dichlormethan-Extraktion gemessene Cortisolkonzentration als unabhängige Variable y bezeichnet. Zur besseren Darstellung des Zusammenhangs zwischen beiden Methoden wurde hier wie bei den folgenden gleichartigen Darstellungen vor der Berechnung der Regressionsgerade auf eine logarithmische Transformation der Meßwerte verzichtet. Wie bereits angesprochen, ist jedoch eine solche Transformation zur exakten Berechnung der statistischen Parameter erforderlich. Nach Durchführung einer logarithmischen Transformation ergab sich zwischen den beiden Trennmethoden ein Korrelationskoeffizient von 0.736. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % und 28 Freiheitsgraden liegt der Grenzwert zur Prüfung des Korrelationskoeffizienten gegen Null bei 0.361. Der berechnete Korrelationskoeffizient von 0.736 liegt über diesem Wert und ist somit signifikant von Null verschieden; es besteht eine signifikante Korrelation zwischen beiden Methoden.

4.3.2. Anwendung von fünf unterschiedlichen Trennverfahren

4.3.2.1. Mittlere Cortisolkonzentrationen in verschiedenen Zeitabschnitten der Spätschwangerschaft nach Anwendung der fünf Trennverfahren

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Untersuchung wurden zur Erfassung der Cortisolmetaboliten bei 20 Fruchtwasserproben gleichzeitig fünf unterschiedliche Trennverfahren angewendet

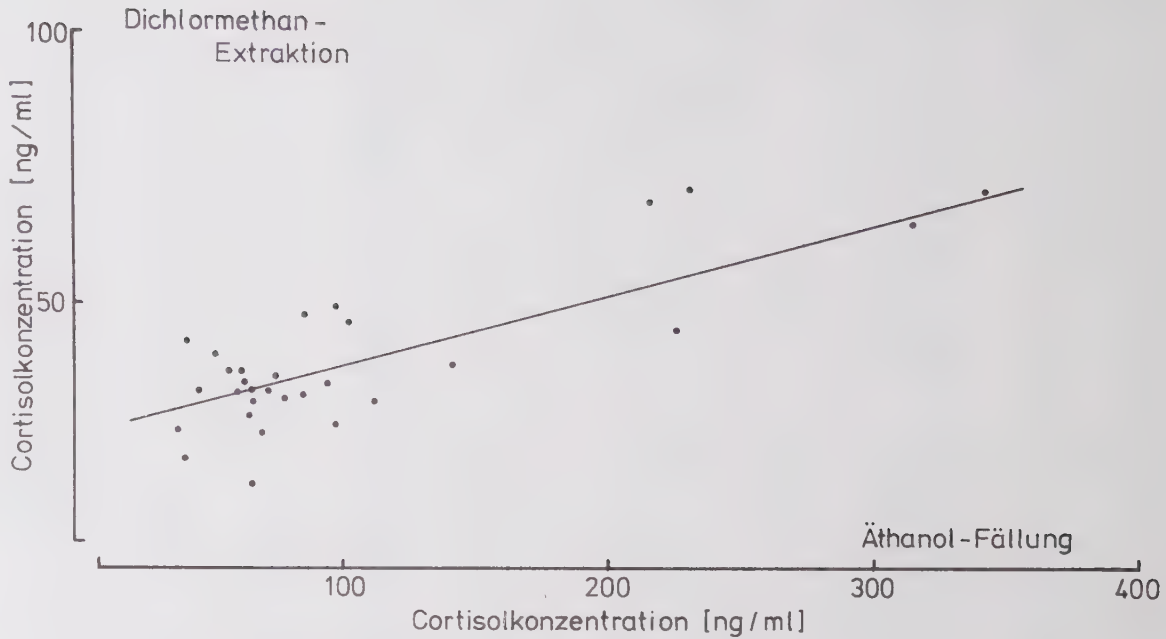


Abb. 33: Diagramm zur Darstellung der Beziehung zwischen der Äthanol-Fällung und der Dichlormethan-Extraktion - es liegen insgesamt 30 Wertepaare vor. Die Gleichung der eingezeichneten Regressionsgeraden lautet: $y = 0.1385 x + 24.7157$. Zur besseren Darstellung der Beziehung wurde vor der Berechnung der Regressionsgeraden auf eine logarithmische Transformation der Meßwerte verzichtet.

(Säulenchromatografie, Dichlormethan-Extraktion, enzymatische Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie, Äthanol-Fällung, ausschließliche enzymatische Hydrolyse). Die praktische Durchführung dieser Trennverfahren wurde bereits im methodischen Teil der Arbeit erläutert, eine weitere Erläuterung der Verfahren und eine Deutung der Ergebnisse erfolgt im Diskussionsteil der Arbeit.

In der Tab. 20 sind die mittleren Cortisolkonzentrationen für die fünf Trennmethoden in den einzeln aufgeführten Zeitabschnitten in der Spätschwangerschaft angegeben. Dabei ist zu vermerken, daß die Kollektivgröße besonders bei den ersten beiden Zeitabschnitten sehr klein ist, so daß die Angabe eines Mittelwertes für die 27. - 29. SSW und die 30. - 32. SSW kaum sinnvoll ist.

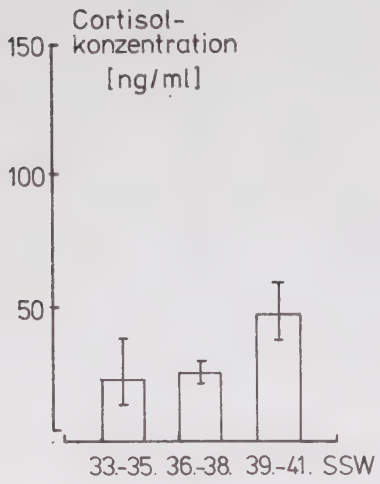
In den Abb. 34 bis 38 sind die Mittelwerte der mit den verschiedenen Methoden in den einzelnen Zeitabschnitten gemessenen Konzentrationen aus der Tab. 20 mit den zugehörigen 1s-Bereichen eingetragen. Die Kennzahlen wurden auch hier über eine logarithmische Transformation der Meßdaten errechnet. In den Abbildungen wurde jeweils nur der Bereich von der 33. bis zur 41. Schwangerschaftswoche berücksichtigt. Wie zu erkennen ist, steigen die Konzentrationen bei den einzelnen Trennmethoden in unterschiedlich starkem Ausmaß an. Dieses Ergebnis wird im folgenden Abschnitt weiter untersucht.

4.3.2.2. Varianzanalytischer Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen der verschiedenen Zeitabschnitte bei fünf Trennmethoden

Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob sich mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse bei den genannten Trennmethoden ein signifikanter Anstieg der Cortisolkonzentrationen in der Spätschwangerschaft sichern läßt. Auf die Voraussetzungen und die Durchführung einer einfachen Varianzanalyse wurde bereits näher eingegangen (S.93). Als Grundlage für die Berechnungen dienten wiederum die mit Hilfe der fünf Trennmethoden in den schon genannten 20 Fruchtwasserproben gemessenen Konzentrationswerte. Dabei wurde die 27. - 29. SSW wegen der geringen Kollektivgröße nicht berücksichtigt.

SSW (n)	Säulen-chromato-grafie	Dichlorm. Extraktion	Hydrolyse/ Säule	Äthanol-Fällung	Hydro-lyse
27. - 29. (2)	37.4	52.7	86.1	98.1	125.
30. - 32. (3)	23.	40.3	47.6	73.3	106.9
33. - 35. (5)	23.1	32.3	51.8	75.3	101.
36. - 38. (5)	25.1	41.	69.8	113.5	155.
39. - 41. (5)	47.	67.3	128.2	276.8	267.9

Tab. 20: Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen im Fruchtwasser von der 27. - 41. SSW nach gleichzeitiger Anwendung der fünf verschiedenen Trennmethoden (alle Konzentrationsangaben in ng/ml). Insgesamt wurden 20 Fruchtwasserproben untersucht.



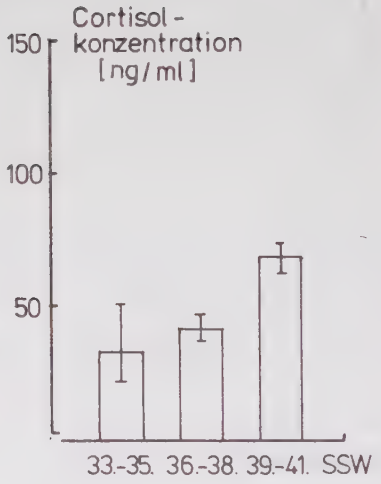
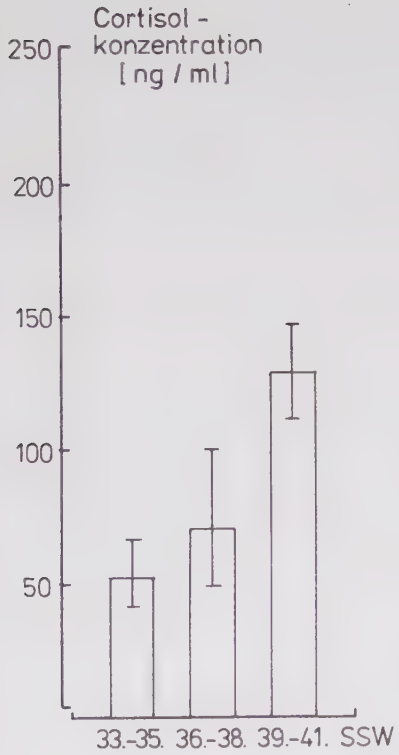


Abb. 34 (links) und Abb. 35 (rechts): Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter nach Anwendung einer Säulenchromatografie (Abb. 34) und einer Dichlormethan-Extraktion (Abb. 35). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte für die einzelnen Zeitabschnitte und die 1s-Bereiche.



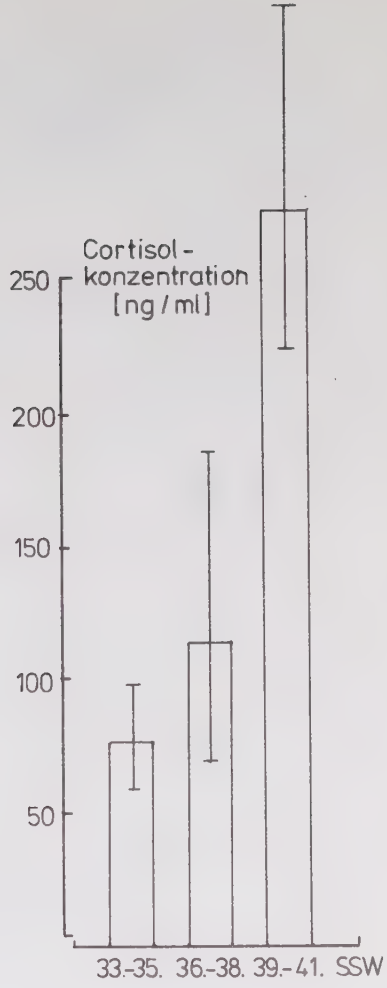


Abb. 36 (links) und Abb. 37 (rechts): Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter nach Anwendung einer Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie (Abb. 36) sowie einer Äthanol-Fällung (Abb. 37). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte für die einzelnen Zeitabschnitte und die 1s-Bereiche.

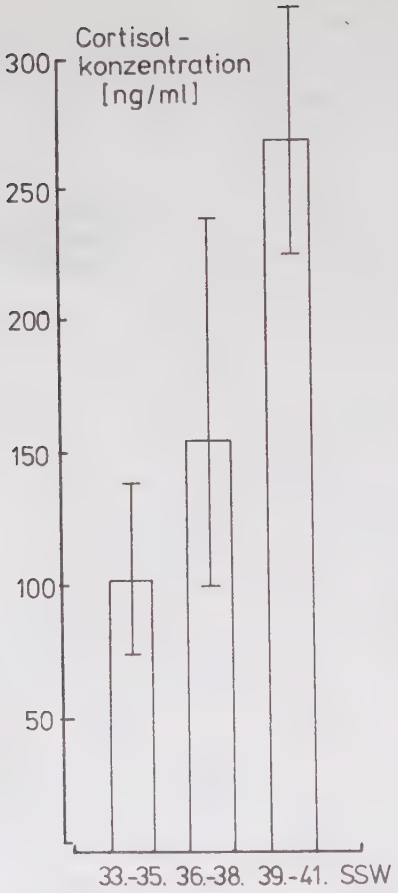


Abb. 38: Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter nach Anwendung einer enzymatischen Hydrolyse. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte für die einzelnen Zeitabschnitte und die 1s-Bereiche.

Wie bereits die Abbildungen 34 bis 38 zeigen, steigt die Cortisolkonzentration bei den einzelnen Trennmethoden in unterschiedlichem Ausmaß an. Im folgenden Abschnitt wird untersucht, ob sich bei allen Trennmethoden ein signifikanter Anstieg nachweisen läßt. Anschließend wird geprüft, welcher Zeitabschnitt bei den einzelnen Methoden erstmals einen Anstieg erkennen läßt.

Die Tab. 21 zeigt das Ergebnis einer einfachen Varianzanalyse für die Säulenchromatografie. Die errechnete Prüfgröße von 3.953 wird - wie bereits erläutert - mit einem kritischen Wert der F-Verteilung verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und insgesamt 18 Beobachtungen (n = 18) aus vier Stichprobengruppen (k = 4) lautet der Tabellenwert im vorliegenden Fall:

$$F_{(3;14;0.05)} = 3.34$$

Dieser Wert wird von dem berechneten F-Wert von 3.953 knapp überschritten; bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % findet sich nach Anwendung einer Säulenchromatografie ein, wenn auch nur knapper, signifikanter Anstieg der Cortisolkonzentration. Die Tabellen 22 bis 25 zeigen die entsprechenden Berechnungen für die anderen Trennmethoden. Der kritische Wert der F-Verteilung beträgt auch bei diesen Tabellen 3.34. Wie die Tabellen zeigen, wird der Wert bei allen Methoden von den berechneten F-Werten überschritten. Damit läßt sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bei allen Trennverfahren ein signifikanter Anstieg der Cortisolkonzentrationen in der Spätschwangerschaft nachweisen.

Im Anschluß an die durchgeführten einfachen Varianzanalysen soll im folgenden untersucht werden, in welchen Zeitabschnitten sich bei den einzelnen Trennmethoden erstmals ein Anstieg der Cortisolkonzentration nachweisen läßt. Bei unseren Untersuchungen wurde wiederum der schon genannte Test nach Scheffe angewendet, eine Darstellung des Tests findet sich bei Sachs (88).

Variations-ursache	FG	SAQ	MAQ	F
Zwischen den Gruppen	3	0.3193	0.1064	3.953
Innerhalb der Gruppen	14	0.3770	0.0269	
Gesamt-Variation	17	0.6963		

Tab. 21: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen vier Zeitabschnitten von der 30. - 41. SSW im Fall der Säulenchromatografie. Die berechnete Prüfgröße F von 3.953 (letzte Spalte) überschreitet den durch die Testbedingungen festgelegten Tabellenwert von 3.34. Damit sind die mittleren Konzentrationen von mindestens zwei Zeitabschnitten voneinander verschieden.

Variations-ursache	FG	SAQ	MAQ	F
Zwischen den Gruppen	3	0.2694	0.0898	6.590
Innerhalb der Gruppen	14	0.1908	0.0136	
Gesamt-Variation	17	0.4602		

Tab. 22: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen vier Zeitabschnitten von der 30. - 41. SSW im Fall der Dichlormethan-Extraktion. Auch hier liegt der F-Wert von 6.59 über dem tabellierten F-Wert von 3.34.

Variations-ursache	FG	SAQ	MAQ	F
Zwischen den Gruppen	3	0.5139	0.1713	15.167
Innerhalb der Gruppen	14	0.1581	0.0113	
Gesamt-Variation	17	0.6720		

Tab. 23: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen vier Zeitabschnitten von der 30. - 41. SSW im Fall der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie. Der berechnete F-Wert von 15.167 liegt deutlich über dem tabellierten F-Wert von 3.34. Damit sind die mittleren Konzentrationen von mindestens zwei Zeitabschnitten voneinander verschieden.

Variations-ursache	FG	SAQ	MAQ	F
Zwischen den Gruppen	3	1.0034	0.3345	15.673
Innerhalb der Gruppen	14	0.2988	0.0213	
Gesamt-Variation	17	1.3021		

Tab. 24: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen vier Zeitabschnitten von der 30. - 41. SSW im Fall der Äthanol-Fällung. Der berechnete F-Wert von 15.673 liegt deutlich über dem tabellierten F-wert von 3.34.

Variations-ursache	FG	SAQ	MAQ	F
Zwischen den Gruppen	3	0.5309	0.1770	10.045
Innerhalb der Gruppen	14	0.2466	0.0176	
Gesamt-Variation	17	0.7775		

Tab. 25: Einfache Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen vier Zeitabschnitten von der 30. - 41. SSW im Fall der enzymatischen Hydrolyse. Der berechnete F-Wert von 10.045 liegt über dem tabellierten F-Wert von 3.34. Damit sind die mittleren Cortisolkonzentrationen von mindestens zwei Zeitabschnitten voneinander verschieden.

Die Tabellen 26 bis 30 zeigen jeweils in der letzten Spalte das Ergebnis dieses Tests für die verschiedenen Trennmethoden. Dabei sind in dieser Spalte bei den jeweiligen Zeitabschnitten die Nummern derjenigen Abschnitte aufgeführt, deren mittlere Cortisolkonzentrationen sich von dem Mittelwert des betreffenden Abschnitts unterscheiden. Wegen der besseren Übersichtlichkeit ist in der Tabelle bei einem bestehenden Unterschied zwischen zwei Zeitabschnitten nur der spätere Abschnitt gekennzeichnet. Zusätzlich sind für jeden Zeitabschnitt die Anzahl der Versuchspersonen, die mittlere Cortisolkonzentration und die 95%-Vertrauensbereiche für die Mittelwerte aufgeführt.

Bei der Säulenchromatografie (Tab. 26) ließ sich mit dem Scheffe-Test kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen zwei Zeitabschnitten nachweisen. Dieses Ergebnis entspricht im Prinzip dem Resultat der Varianzanalyse, da auch bei dieser Methode nur sehr knapp ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Zeitabschnitten nachgewiesen werden konnte. Die abweichenden Ergebnisse beider Testverfahren dürften auf den unterschiedlichen theoretischen und methodischen Grundlagen der Verfahren beruhen. Weiterhin soll nochmals darauf hingewiesen werden, daß das Aufstellen von Vertrauensbereichen bei kleinen Kollektivumfängen problematisch ist und nur einen geringen Aussagewert besitzt. Beispielsweise erstreckt sich der 95%-Vertrauensbereich für den Mittelwert im Falle der Säulenchromatografie in der 30. - 32. SSW (drei Beobachtungen) über den Konzentrationsbereich von 5.6 ng/ml bis 94.4 ng/ml. Bei einer größeren Anzahl der Beobachtungen werden die Vertrauensbereiche deutlich kleiner. Wie bereits angegeben, versteht man unter dem Vertrauensbereich des Mittelwertes ein Intervall, das den Mittelwert der Grundgesamtheit mit der jeweils angegebenen Wahrscheinlichkeit enthält.

Bei der Dichlormethan-Extraktion (Tab. 27) besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Mittelwerten der 39. - 41. SSW einerseits und der 33. - 35. SSW andererseits, weitere Unterschiede ließen sich nicht nachweisen.

Säulenchromatografie

Nr.	SSW	n	$\bar{x}$ [ng/ml]	95%-VB für $\bar{x}$ [ng/ml]	Es besteht ein sign. Unterschied zur Gruppe mit der Nr.
1	30. - 32.	3	23.	5.6 - 94.4	-
2	33. - 35.	5	23.1	12.2 - 43.9	-
3	36. - 38.	5	25.1	20.9 - 30.	-
4	39. - 41.	5	47.	35.5 - 62.3	-

Tab. 26: Schematische Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen für die aufgeführten Zeitabschnitte von der 30. - 41. SSW nach Anwendung der Säulenchromatografie. Bei einem signifikanten Ergebnis der Varianzanalyse läßt sich mit einem weiteren Testverfahren (Test nach Scheffe) prüfen, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Bei der Säulenchromatografie ließ sich mit diesem Verfahren kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Zeitabschnitten feststellen.

Dichlormethan-Extraktion

Nr.	SSW	n	$\bar{x}$ [ng/ml]	95%-VB für $\bar{x}$ [ng/ml]	Es besteht ein sign.Unterschied zur Gruppe mit der Nr.
1	30. - 32.	3	40.3	20.2 - 80.4	-
2	33. - 35	5	32.3	18.7 - 55.8	-
3	36. - 38.	5	41.	35.3 - 47.5	-
4	39. - 41.	5	67.3	61. - 74.4	2

Tab. 27: Schematische Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen für die aufgeführten Zeitabschnitte von der 30. bis 41. SSW nach Anwendung der Dichlormethan-Extraktion. Genau wie bei der Säulenchromatografie wurde geprüft, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden (letzte Spalte). Dabei sind bei den jeweiligen Zeitabschnitten die Nummern derjenigen Abschnitte aufgeführt, deren mittlere Cortisolkonzentrationen sich von dem Mittelwert des betreffenden Abschnitts unterscheiden. Wegen der besseren Übersichtlichkeit ist bei einem Unterschied zwischen zwei Mittelwerten nur der spätere Abschnitt gekennzeichnet. Im vorliegenden Fall unterscheiden sich die Mittelwerte der 39. - 41. SSW und der 33. - 35. SSW.

Enzymatische Hydrolyse mit Säulenchromatografie

Nr.	SSW	n	$\bar{x}$ [ng/ml]	95%-VB für $\bar{x}$ [ng/ml]	Es besteht ein sign.Unterschied zur Gruppe mit der Nr.
1	30. - 32.	3	47.6	35.6 - 63.5	-
2	33. - 35.	5	51.8	38.5 - 69.8	-
3	36. - 38.	5	69.8	44.9 - 108.7	-
4	39. - 41.	5	128.2	108.2 - 152.	1, 2, 3

Tab. 28: Schematische Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen für die aufgeführten Zeitabschnitte von der 30. - 41. SSW nach Anwendung der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie. Genau wie bei den vorstehenden Tabellen wurde geprüft, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Im vorliegenden Fall besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischem dem Mittelwert der 39. - 41. SSW einerseits und den Mittelwerten der früheren Zeitabschnitte andererseits.

Äthanol-Fällung

Nr.	SSW	n	$\bar{x}$ [ng/ml]	95%-VB für $\bar{x}$ [ng/ml]	Es besteht ein sign.Unterschied zur Gruppe mit der Nr.
1	30. - 32.	3	73.3	32.9 - 163.3	-
2	33. - 35.	5	75.3	55.0 - 103.1	-
3	36. - 38.	5	113.5	61.9 - 208.1	-
4	39. - 41.	5	276.8	214.9 - 356.7	1, 2, 3

Tab. 29: Schematische Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen für die aufgeführten Zeitabschnitte von der 30. - 41. SSW nach Anwendung einer Äthanol-Fällung. Genau wie bei den vorstehenden Tabellen wurde geprüft, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Im vorliegenden Fall besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen dem Mittelwert der 39. - 41. SSW einerseits und den Mittelwerten der früheren Zeitabschnitte andererseits.

Enzymatische Hydrolyse

Nr.	SSW	n	$\bar{x}$ [ng/ml]	95%-VB für $\bar{x}$ [ng/ml]	Es besteht ein sign. Unterschied zur Gruppe mit der Nr.
1	30. - 32.	3	106.9	83.2 - 137.3	-
2	33. - 35.	5	101.	68.3 - 149.3	-
3	36. - 38.	5	155.	89.8 - 267.2	-
4	39. - 41.	5	267.9	216. - 332.1	1, 2, 3

Tab. 30: Schematische Darstellung der mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen für die aufgeführten Zeitabschnitte von der 30. - 41. SSW nach Anwendung einer enzymatischen Hydrolyse. Genau wie bei den vorstehenden Tabellen wurde geprüft, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Im vorliegenden Fall besteht ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen dem Mittelwert der 39. - 41. SSW einerseits und den Mittelwerten der früheren Zeitabschnitte andererseits.

Bei den übrigen Methoden (enzymatische Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie, Äthanol-Fällung, enzymatische Hydrolyse) besteht jeweils ein Konzentrationsunterschied zwischen den Mittelwerten der 39. - 41. SSW einerseits und den Mittelwerten der früheren Zeitabschnitte andererseits. Eine Interpretation der genannten Ergebnisse erfolgt im Diskussionsteil.

4.3.2.3. Darstellung der Beziehungen zwischen den einzelnen Trennmethoden

In den Abb. 39 bis 41 sind anhand von Punktediagrammen die Beziehungen zwischen den einzelnen Trennmethoden dargestellt. Weiterhin sind in jedem Diagramm die berechneten Regressionsgeraden eingezeichnet; die zugehörigen Regressionsgleichungen sind jeweils in den Abbildungslegenden aufgeführt. Bei den Abbildungen wurde jeweils die mit der auf der Abszisse eingetragenen Methode gemessene Konzentration als unabhängige Variable x bezeichnet und die mit der auf der Ordinate eingetragene Methode gemessene Konzentration als abhängige Variable y bezeichnet. Eine umgekehrte Darstellung der Beziehung ist natürlich in jedem Fall möglich. Zur besseren Darstellung der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Trennmethoden wurde bei den Darstellungen vor der Berechnung der Regressionsgeraden auf eine logarithmische Transformation der Meßwerte verzichtet. Wie bereits angesprochen, ist jedoch eine solche Transformation zur exakten Berechnung der statistischen Parameter erforderlich.

Die Streuungen der Punktwolken bei den einzelnen Abbildungen zeigen bereits, daß zwischen den Methoden ein unterschiedlich starker Zusammenhang besteht. Zur genauen Darstellung der Zusammenhänge wurden alle Konzentrationswerte logarithmisch transformiert und eine Korrelationstabelle aufgestellt. Die Tabelle 31 zeigt die Korrelationskoeffizienten zwischen den mit Hilfe der fünf Trennmethoden gemessenen Konzentrationswerten und die 95%-Vertrauensbereich der Korrelationskoeffizienten. Wie die Tabelle zeigt, besteht zwischen der Äthanol-Fällung und der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie die höchste

Korrelation (0.95), gefolgt von der Korrelation zwischen der Äthanol-Fällung und der Hydrolyse (0.94) und weiter gefolgt von der Korrelation zwischen der Dichlormethan-Extraktion und der Säulenchromatografie (0.88). Eine geringere Korrelation bestand zwischen der Säulenchromatografie und der Dichlormethan-Extraktion auf der einen Seite und der Äthanol-Fällung auf der anderen Seite. Im Diskussionsteil wird noch näher auf diese Ergebnisse eingegangen.

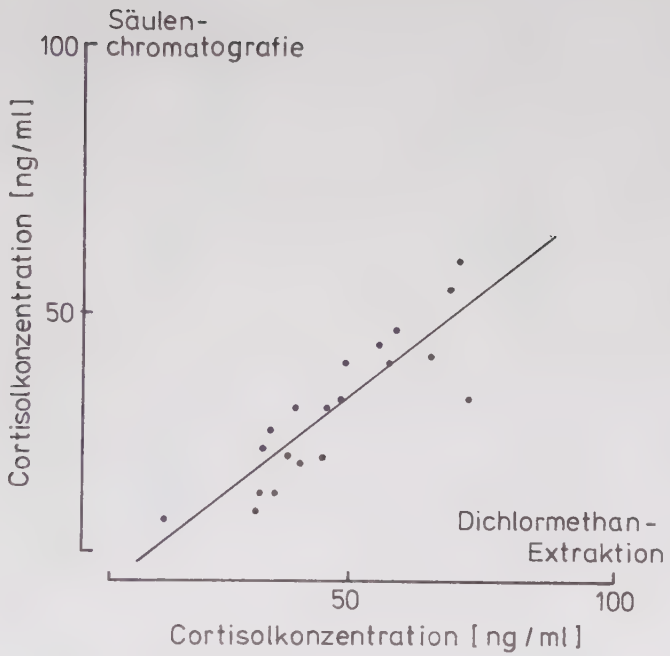


Abb. 39: Diagramm zur Darstellung der Beziehung zwischen der Säulenchromatografie und der Dichlormethan-Extraktion - es liegen insgesamt 20 Wertepaare vor. Die Gleichung der eingezeichneten Regressionsgerade lautet: $y = 0.7769x - 4.4425$.

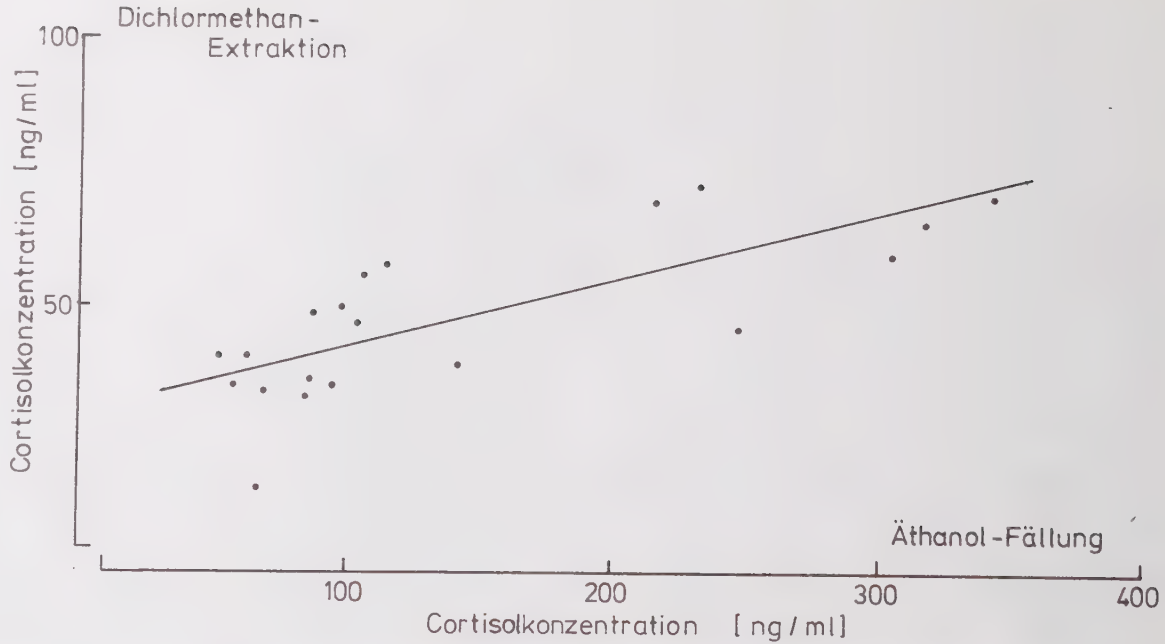


Abb. 40: Diagramm zur Darstellung der Beziehung zwischen der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung - es liegen insgesamt 20 Wertepaare vor. Die Gleichung der eingezeichneten Regressionsgerade lautet: $y = 29.9321x + 0.1224$.

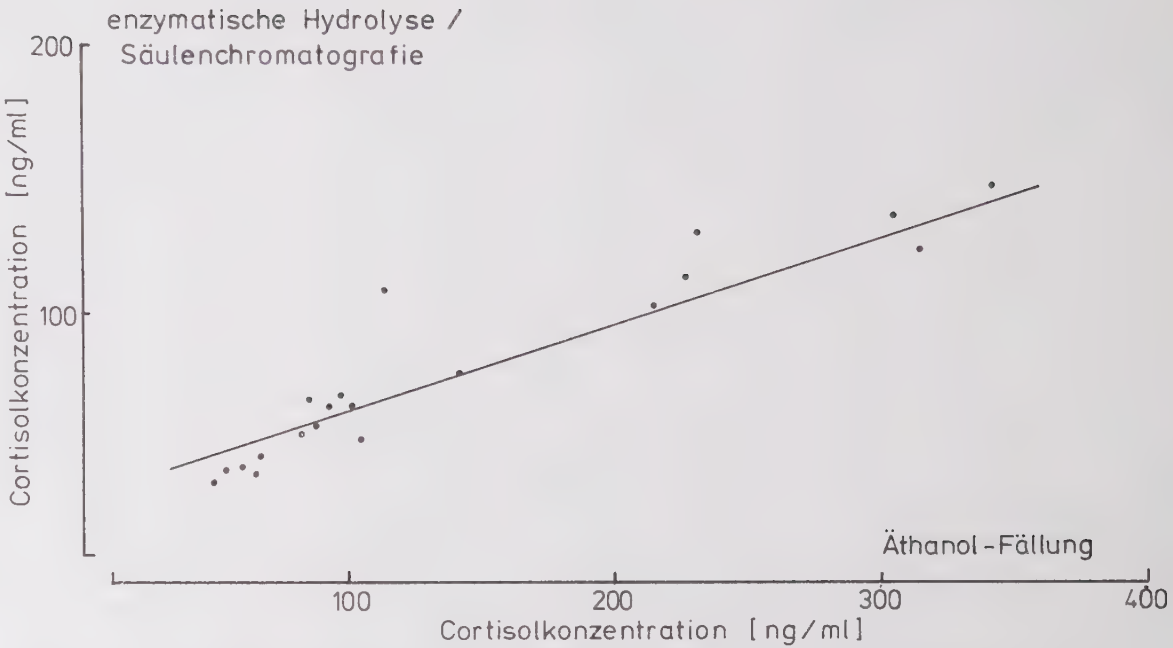


Abb. 41: Diagramm zur Darstellung der Beziehung zwischen der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie und der Äthanol-Fällung - es liegen insgesamt 20 Wertepaare vor. Die Gleichung der eingezeichneten Regressionsgerade lautet: $y = 0.3593x + 28.8189$.

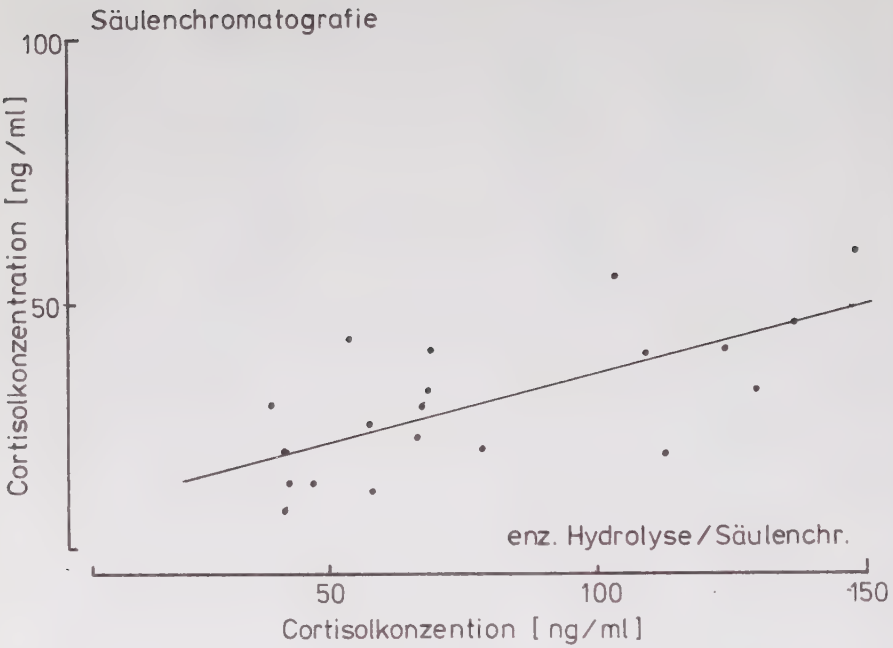


Abb. 42: Diagramm zur Darstellung der Beziehung zwischen der Säulenchromatografie und der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie - es liegen insgesamt 20 Wertepaare vor. Die Gleichung der eingezeichneten Regressiongerade lautet: $y = 0.256x + 11.8771$.

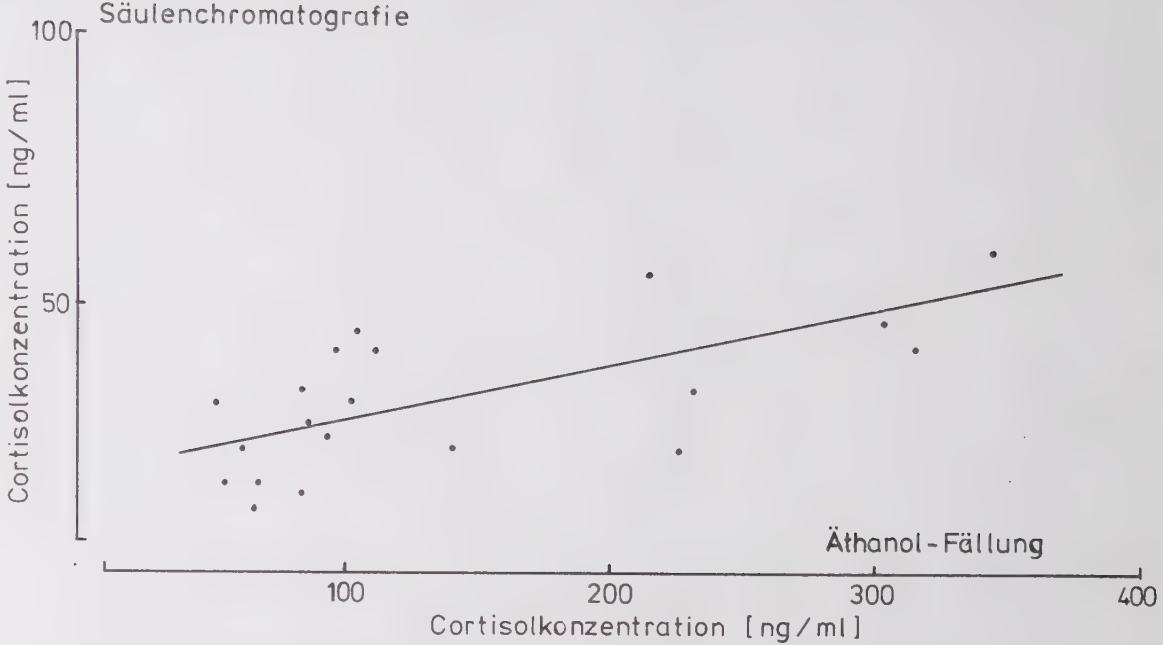


Abb. 43: Diagramm zur Darstellung der Beziehung zwischen der Säulenchromatografie und der Äthanol-Fällung - es liegen insgesamt 20 Wertepaare vor. Die Gleichung der Regressionsgerade lautet: y = 0.0964x + 18.6301.

	Säulen-chrom.	Dichlorm.-Extraktion	enzym. Hydrolyse/ Säulenchrom.	Äthanol-Fällung	enzym. Hydrolyse
Säulen-chrom.	X	0.88 (0.7 -0.94)	0.66 (0.3 -0.85)	0.64 (0.3 -0.85)	0.46 (0.05-0.75)
Dichlorm. Extraktion	0.88 (0.7 -0.94)	X	0.74 (0.45-0.88)	0.7 (0.35-0.86)	0.55 (0.16-0.8)
enzym. Hydrolyse/ Säulenchr.	0.66 (0.3 -0.85)	0.74 (0.45-0.88)	X	0.95 (0.89-0.96)	0.88 (0.7 -0.94)
Äthanol-Fällung	0.64 (0.3 -0.85)	0.7 (0.35-0.86)	0.95 (0.89-0.96)	X	0.94 (0.87-0.96)
enzym. Hydrolyse	0.46 (0.05-0.75)	0.55 (0.16-0.8)	0.88 (0.7 -0.94)	0.94 (0.87-0.96)	X

Tab. 31: Korrelationskoeffizienten zwischen fünf verschiedenen Bestimmungsmethoden mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen (in Klammern). Dargestellt sind die Versuchsergebnisse von parallelen Konzentrationsmessungen bei 20 verschiedenen Fruchtwasserproben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0.05 waren alle Korrelationskoeffizienten von Null signifikant verschieden.

5. Diskussion

5.1. Einführung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, den zeitlichen Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser bei Patientinnen mit unauffälliger sowie bei Patientinnen mit gestörter Schwangerschaft zu bestimmen. Gleichzeitig sollten Normalbereiche für die Konzentrationen dieses Steroidhormons im Fruchtwasser angegeben werden. Dabei bestätigte sich bei unseren Analysen die in der bisherigen Literatur beschriebene Beobachtung (6, 10), daß sich bei parallel durchgeführter Äthanol-Fällung und Dichlormethan-Extraktion unterschiedliche Hormonkonzentrationen in den Fruchtwasserproben ergaben.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der Versuch unternommen, die beschriebenen Konzentrationsdifferenzen auf die Existenz von Cortisolmetaboliten zurückzuführen, die von beiden Methoden in unterschiedlichem Ausmaß erfaßt wurden. Entsprechende Untersuchungen waren früher schon am Urin von Neugeborenen durchgeführt worden, wobei ähnliche Differenzen festgestellt worden waren (58, 59). Bei der praktischen Durchführung der Versuche wurden unterschiedliche Extraktionsverfahren, eine enzymatische Hydrolyse und eine Säulenchromatografie in verschiedenen Kombinationen angewendet, so daß sich insgesamt fünf Analysewege ergaben (vgl. Abb. 4).

Im folgenden werden zunächst die Resultate der methodischen Untersuchungen kurz zusammengefaßt und diskutiert. Daraufhin werden die Ergebnisse nach Anwendung der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung besprochen. Anschließend folgt eine Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse nach Anwendung der fünf unterschiedlichen Trennverfahren. Im letzten Abschnitt wird auf die Bedeutung der hier dargestellten Untersuchungen für den fetalen Glucocorticoid-Stoffwechsel eingegangen.

5.2. Besprechung der methodischen Untersuchungen

Zunächst werden die Untersuchungen zur Zuverlässigkeit der angewandten Bestimmungsverfahren erörtert. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, besonders der beabsichtigte Vergleich zwischen den mit verschiedenen Trennmethoden gemessenen Hormonkonzentrationen, erforderte bestimmte Voraussetzungen bei den Analysemethoden, die im folgenden näher erläutert werden.

5.2.1. Konstanz der Versuchsbedingungen

Bei den Verlaufskontrollen sollten die Versuchsbedingungen für die Proben einer Patientin möglichst konstant gehalten werden. Deswegen wurden alle Proben einer Verlaufsserie in einem Testansatz bestimmt, wobei zur Kontrolle von unbemerkten Schwankungen der Versuchsbedingungen Proben aus der Standardkurve an verschiedenen Stellen des Ansatzes eingefügt wurden. Die Abb. 13 zeigt Übereinstimmung der Lage eines Versuchsansatzes von drei Standardkurven, die an verschiedenen Stellen bestimmt worden waren.

Zur weiteren Kontrolle von Streuungen innerhalb eines Versuchsansatzes wurde die Präzision in der Serie bestimmt. Sie betrug bei der Äthanol-Fällung 2.9 % und bei der Dichlormethan-Extraktion 4.2 %, jeweils ohne einen Verlustausgleich mit Hilfe eines radioaktiv markierten internen Standards (Tab. 5). Da die Konzentrationswerte auch innerhalb einer Verlaufsserie über einen großen Konzentrationsbereich verteilt waren, sollte in Übereinstimmung mit den in der Einleitung besprochenen Kriterien die Streuung an verschiedenen Punkten der Standardkurve kontrolliert werden. Ein solcher Versuch wurde bei der Kontrolle der Präzision von Tag zu Tag durchgeführt. Die Tab. 6 zeigt, daß der Variationskoeffizient bei den höheren Konzentrationen nur wenig höher als bei den niedrigen lag. Außerdem wurde bei der praktischen Durchführung der Versuche weitgehend im geraden Teil der Dosis-Wirkungs-Kurve gearbeitet, wo die Streuung annähernd symmetrisch verteilt war.

Für den Vergleich von Meßergebnissen aus verschiedenen Versuchsansätzen wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt; die Tab. 6 zeigt die Ergebnisse für zwei verschiedene Fruchtwasserproben mit unterschiedlichen Konzentrationen, die jeweils aus einer größeren Anzahl von Proben zusammengestellt waren. Gleichzeitig wurde versucht, die Versuchsbedingungen über die ganze Studie hinweg konstant zu halten; es wurde beispielsweise nur Antiserum aus einer Charge verwendet. Die Arbeitsverdünnung des Antikörpers lag bei etwa 40 - 50 % Bindung am Nullpunkt und blieb bei den Versuchen weitgehend konstant (Abb. 6). Die Antikörper-Inkubationszeiten (Abb. 8) und die Kohle-Äquilibrierungszeiten (Abb. 5) wurden so gewählt, daß Schwankungen im Zeitablauf des Versuchsansatzes wenig Einfluß auf die Qualität der Ergebnisse hatte. In einem anderen Versuch wurde die Konzentration des Antiserums und des radioaktiv markierten Hormons bestimmt, bei denen sich ein optimaler Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve ergab (Abb. 14-16). Diese Ergebnisse dienten zur Einstellung des Radioimmuntests.

5.2.2. Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Bei einem Vergleich der Radioimmuntests von verschiedenen Arbeitsgruppen ergeben sich einige grundsätzliche Probleme, wie schon in der Einleitung dargestellt. Zur Kontrolle der Richtigkeit der angewandten Methoden wurde die Wiederfindung von eingesetztem Cortisol überprüft (Tab. 2 und 3). Außerdem wurde die Lage der Dosis-Wirkungs-Kurve mit einer Standardkurve verglichen, die aus einer handelsüblichen Standardlösung hergestellt wurde (Abb. 12). Weiterhin wurde an einem Ringversuch der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie teilgenommen (Tab. 4). Die angeführten Tabellen und Abbildungen zeigen die durchweg guten Ergebnisse der durchgeführten Kontrollen.

Die Wasserleerwerte und die Leerwerte bei der Bestimmung von hormonfreiem Fruchtwasser lagen bei der Äthanol-Fällung bei Null, bei der Dichlormethan-Extraktion nur wenig über Null (Tab. 8).

Die für einen Vergleich bedeutsamen Kreuzreaktionen einiger wichtiger Steroide im Radioimmuntest wurden bestimmt; die Tab. 1 und die Abb. 17 bis 19 zeigen die Ergebnisse. Auffällig und für die spätere Diskussion von Wichtigkeit war die hohe Kreuzreaktion von Cortisol-Sulfat und die geringe Kreuzreaktion von 6ß-Hydroxycortisol.

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nach Anwendung der verschiedenen Trennmethoden ist, daß die methodischen Fehler der einzelnen Verfahren annähernd übereinstimmen. Eine solche Voraussetzung erscheint schwierig, da die Methoden unterschiedlich aufgebaut sind und die mit ihrer Hilfe gemessenen Hormonkonzentrationen in verschiedenen Bereichen der Dosis-Wirkungs-Kurve liegen.

Die Präzision in der Serie lag bei der Säulenchromatografie bei 5.9 % und bei der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie bei 4.9 % (Tab. 9 und 11). Über die Präzision der anderen Methoden wurde schon berichtet. Damit ist die Präzision der einzelnen Trennmethoden weitgehend vergleichbar. Zusätzlich wurden die Endverdünnungen bei den einzelnen Methoden so gewählt, daß weitgehend im linearen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve gearbeitet wurde.

Ein besonderes Problem stellte die Wiederfindung von radioaktivem Hormon nach Durchführung der Säulenchromatografie dar. Nachdem die verwendete Tracerlösung vorher mit einer Chromatografie von Zerfallsprodukten gereinigt worden war, lag die Wiederfindung schließlich bei 80 %.

Das Elutionsdiagramm der Sephadex-LH 20-Säulenchromatografie zeigt die Abb. 20. Von Bedeutung war die Lage des Cortison-Peaks in der Nähe des Cortisol-Peaks.

Die enzymatische Hydrolyse war, gemessen an der Spaltung von Cortisolsulfat, weitgehend vollständig. Die mögliche Anwesenheit von Hemmfaktoren in Analogie zum menschlichen Urin erklärt mögliche Unterschiede zur tatsächlich vorhandenen Konzentration von Cortisolsulfat (83). Weiter von Bedeutung war, daß das

Cortisolsulfat nach Durchführung einer Säulenchromatografie im anschließenden Radioimmuntest nicht erfaßt wurde.

5.3. Besprechung der Ergebnisse nach Anwendung der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung

Als nächstes werden die Ergebnisse dargestellt, die sich nach Anwendung der Äthanol-Fällung und der Dichlormethan-Extraktion bei den einzelnen Fruchtwasserproben ergaben. In den Tab. 12 und 13 sind die Mittelwerte mit den zugehörigen 1s-Bereichen für verschiedene Zeitabschnitte in der Spätschwangerschaft dargestellt (unter Ausschluß von Konzentrationsangaben aus sicher pathologischen Verläufen). Dabei wurden in der Zeit von der 27. bis zur 41. Schwangerschaftswoche jeweils drei Wochen zu einem Abschnitt zusammengefaßt, so daß sich insgesamt fünf Abschnitte ergaben. Bei den Tabellen wurden außer Einzelbestimmungen auch Verläufe berücksichtigt, wobei allerdings eine bestimmte Patientin in einem Zeitabschnitt nur mit einem Konzentrationswert vertreten war.

Die Tab. 12 enthält die Cortisolkonzentration nach Anwendung der Äthanol-Fällung. Bei dieser Methode steigt die Cortisolkonzentration ab der 27. Woche mit einem vorübergehenden Konzentrationsabfall in der 30. bis 32. Schwangerschaftswoche an. Es besteht ein deutlicher Anstieg zwischen der 33. bis 35. Woche einerseits und der 36. bis 38. Woche andererseits von 67 ng/ml auf 107 ng/ml. Zwischen der 36. bis 38. und der 39. bis 41. SSW bestand ein noch stärkerer Anstieg von 107 ng/ml auf 243 ng/ml. Auffällig war ein geringer Abfall der Cortisolkonzentration in der 30. bis 32. SSW von 58 ng/ml auf 54 ng/ml mit einem nachfolgenden Anstieg auf 67 ng/ml in der 33. bis 35. Schwangerschaftswoche.

Die dargestellten Konzentrationsangaben decken sich weitgehend mit den in der Literatur berichteten Werten, bei denen die Fruchtwasserproben mit Äthanol extrahiert bzw. unvorbehandelt mit einem Radioimmuntest bestimmt worden waren. Fencl et al. bestimmten eine Gesamt-Cortisol-Konzentration von 32 ng/ml in der 20. bis 34. SSW und von 72 ng/ml in der 35. bis 40. SSW.

Nach der 40. SSW lag die Cortisol-Konzentration bei 140 ng/ml (6). Sivakumaran et al. berichteten über eine Cortisolkonzentration von 103 ng/ml in der 33. bis 34. SSW, von 144 ng/ml in der 35. bis 36. SSW, von 202 ng/ml in der 37. bis 40. SSW und von 290 ng/ml in der 41. bis 42. SSW. Vor der 32. SSW betrug die Cortisolkonzentration 139 ng/ml und nach der 42. SSW fiel sie auf 204 ng/ml ab (9). Die von Aderjan et al. beschriebenen Konzentrationen lagen im gleichen Bereich (10). In Übereinstimmung mit unseren Befunden berichteten Murphy et al. über einen vorübergehenden Abfall der Cortisolkonzentration um die 33. SSW (4).

Die Tab. 13 läßt erkennen, daß die parallel durchgeführte Dichlormethan-Extraktion zu wesentlich niedrigeren Werten führte. Die Konzentrationen lagen bis zur 35. SSW bei etwa 31 ng/ml, in der 36. bis 38. SSW bei 34 ng/ml und in der 39. bis 41. SSW bei 58 ng/ml. Genau wie bei der Äthanol-Fällung ließ sich auch hier ein vorübergehender Abfall der Cortisolkonzentration um die 33. Schwangerschaftswoche nachweisen.

Murphy et al. fanden nach Extraktion mit Dichlormethan eine Cortisolkonzentration von 10 ng/ml bis zur 35. SSW. In der 38. SSW betrug die Konzentration 15 ng/ml und in der 40. SSW 22 ng/ml (4). Gennser et al. berichteten über einen Cortisolspiegel von 25 ng/ml bis zur 36. SSW. Nach der 36. SSW betrug die Cortisolkonzentration 33 ng/ml (84). Tan et al. fanden nach Durchführung einer Säulenchromatografie in der 30. bis 40. SSW eine Cortisolkonzentration von 20 ng/ml und nach der 40. SSW eine Cortisolkonzentration von 26 ng/ml (7). Dabei ist die Säulenchromatografie, wie später gezeigt, mit der Dichlormethan-Extraktion vergleichbar.

Zur Darstellung von Verlaufskurven wurde bei den Patientinnen, bei denen mehrere Konzentrationsangaben aus verschiedenen Zeitabschnitten zur Verfügung standen, jeweils ein Einzelwert nach einem Zufallsplan ausgewählt und dem zugehörigen Zeitabschnitt zugeteilt. Die Tab. 14 und Tab. 15 zeigen die auf diese Weise berechneten mittleren Cortisolkonzentrationen mit den zugehörigen 1s-Bereichen

in den verschiedenen Zeitabschnitten für beide Trennmethoden. Die Konzentrationsangaben dieser Tabellen sind in Abb. 29 und Abb. 30 für die Äthanol-Fällung und in Abb. 31 und Abb. 32 für die Dichlormethan-Extraktion grafisch dargestellt. Dabei sind in Abb. 30 und Abb. 32 zusätzlich einige Konzentrationswerte und Verläufe von auffälligen Schwangerschaften eingezeichnet; eine Diskussion dieser Verläufe erfolgt in einem späteren Abschnitt. Die Abbildungen zeigen, daß sich nach Anwendung einer Äthanol-Fällung ein deutlicher Konzentrationsanstieg etwa ab der 36. SSW findet, während der Konzentrationsanstieg im Falle der Dichlormethan-Extraktion weniger deutlich ist. Im folgenden werden die Verlaufskurven mit Hilfe von varianzanalytischen Methoden untersucht. Dabei ist die Anwendbarkeit und Aussagekraft dieser Methoden bestimmten Einschränkungen unterworfen, die bereits im Ergebnisteil erläutert wurden (vgl. S.93).

Die Tab. 16 zeigt das Ergebnis einer einfachen Varianzanalyse zum Vergleich der mittleren Cortisolkonzentrationen zwischen den schon angeführten fünf Zeitabschnitten in der Spätschwangerschaft nach Anwendung der Äthanol-Fällung. Die praktische Durchführung dieser Methode und die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurde bereits näher erläutert (vgl. S.93). Im vorliegenden Fall überschreitet die errechnete Prüfgröße F von 20.798 einen durch die jeweiligen Testbedingungen festgelegten Tabellenwert von 2.76, somit sind die mittleren Cortisolkonzentrationen von mindestens zwei Zeitabschnitten voneinander verschieden. Wie bereits erläutert, läßt sich mit weiteren Testverfahren prüfen, welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Die Tab. 18 zeigt in der letzten Spalte das Ergebnis dieses Tests für die Äthanol-Fällung. Nach Anwendung dieser Methode läßt sich in der 36. SSW ein signifikanter Konzentrationsanstieg gegenüber den vorhergehenden Zeitabschnitten nachweisen. In der 39. SSW findet sich nochmals ein signifikanter Anstieg der Cortisolkonzentration. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen der schon erwähnten Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls über einen deutlichen Anstieg der Cortisolkonzentration um die 36. SSW berichteten (6, 9, 10).

Nach Anwendung einer Dichlormethan-Extraktion ließ sich ebenfalls mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse ein Unterschied zwischen den Cortisolkonzentrationen von mindestens zwei Zeitabschnitten nachweisen (Tab. 17). Bei dieser Methode läßt sich im Vergleich zur Äthanol-Fällung erst ab der 39. SSW ein signifikanter Anstieg der Cortisolkonzentration sichern. Einschränkend ist zu sagen, daß diese Beobachtung nicht unbedingt auf einem tatsächlich bestehenden Unterschied zwischen den mit beiden Trennverfahren bestimmten Hormonfraktionen beruhen muß, sondern auch auf unterschiedlichen methodischen Eigenschaften und statistischen Voraussetzungen beruhen kann. Ein ausführlicher Vergleich zwischen den beiden Methoden und eine Diskussion der Befunde erfolgt nach der Besprechung der Einzelverläufe.

Die Tab. 18 und 19 enthalten weiterhin die 95%-Vertrauensbereiche für die mittleren Cortisolkonzentrationen in den einzelnen Zeitabschnitten. Auf die Berechnung dieser Vertrauensbereiche und ihre Bedeutung wurde bereits an anderer Stelle eingegangen (vgl. S. 94). Die Größe der Vertrauensbereiche ist unter anderem von der Anzahl der Beobachtungen abhängig; mit steigendem Stichprobenumfang werden die Vertrauensbereiche kleiner und es werden somit geringere Unterschiede zwischen den Parametern zweier Stichproben durch einen Test als signifikant ausgewiesen. Im vorliegenden Fall ergaben sich bei beiden Trennmethoden aufgrund der geringen Anzahl der Beobachtungen in den einzelnen Zeitabschnitten relativ große Vertrauensbereiche, die sich bei beiden Methoden besonders in den Zeitabschnitten bis zur 35. SSW größtenteils überdeckten. Somit ist es zumindest denkbar, daß eventuell bestehende geringe Konzentrationsanstiege im Zeitraum bis zur 35. SSW von den angewandten Testmethoden nicht erfaßt wurden.

In der Abb. 33 ist der Zusammenhang zwischen den Cortisolkonzentrationen, die sowohl mit Hilfe der Äthonal-Fällung als auch der Dichlormethan-Extraktion gemessen wurden, anhand eines Diagramms dargestellt. Weiterhin ist die berechnete Regressionsgerade eingezeichnet. Der Korrelationskoeffizient betrug im vorliegenden Fall 0.736, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % war die Korrelation signifikant. Die Abbildung läßt vermuten, daß zwischen beiden Trennmethoden eine lineare Beziehung besteht.

Auffallend ist jedoch, daß die Regressionsgerade nicht durch den Nullpunkt des Diagramms verläuft. Dieses Verhalten läßt unter anderem darauf schließen, daß die Methoden unterschiedliche Hormonanteile erfassen.

Die Abb. 21 bis 28 zeigen die zeitlichen Verläufe der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von 12 Patientinnen, bei denen parallel eine Äthanol-Fällung sowie eine Dichlormethan-Extraktion durchgeführt worden war. Bei den Patientinnen 4, 5, 11 und 12 traten Komplikationen in der Schwangerschaft auf. Bei den Abbildungen sind jeweils zuerst die Diagramme mit den Verlaufskurven dargestellt, die sich nach Anwendung einer Äthanol-Fällung ergaben. Darunter sind die mit Hilfe einer Dichlormethan-Extraktion erhaltenen Verläufe dargestellt.

Die mit der Äthanol-Fällung bestimmten Verläufe zeigten in jedem der 12 Fälle einen deutlichen Konzentrationsanstieg, während bei der Dichlormethan-Extraktion nur in sechs Fällen (Nr. 2, 3, 5, 7 11 und 12) ein Konzentrationsanstieg nachzuweisen war. In diesem Zusammenhang fällt weiterhin auf, daß bei den Fällen 4, 8, 9 und 10 bei der Äthanol-Fällung ein deutlicher Konzentrationsanstieg zu beobachten war, während bei den zugehörigen Werten nach Dichlormethan-Extraktion ein Abfall der Verlaufskurven auftrat. Außerdem lagen die mit Hilfe der Dichlormethan-Extraktion bestimmten Verlaufskurven näher beisammen als bei der Äthanol-Fällung.

Das eben beschriebene unterschiedliche Verhalten der Verlaufskurven ist möglicherweise dafür verantwortlich, daß bei der Dichlormethan-Extraktion im Gegensatz zur Äthanol-Fällung in der Spätschwangerschaft ein nur zögernder Anstieg der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser zu beobachten ist. Bei den Patientinnen, bei denen ein abweichendes Verhalten der Verlaufskurven zu beobachten war, trat nur in einem Fall (Nr. 4) eine Schwangerschaftskomplikation in Form einer schweren Rh-Inkompatibilität mit Geburt eines unreifen Kindes auf. In den übrigen Fällen verliefen die Schwangerschaften unauffällig.

Wie bereits angesprochen, wichen die Verlaufskurven im Falle der Dichlormethan-Extraktion außer bei einem Verlauf (Nr. 8) nur wenig voneinander ab. Bei den mit Hilfe der Äthanol-Fällung bestimmten Verlaufskurven waren bei den Patientinnen 2, 8 und 11 abweichend niedrige Verlaufswerte festzustellen. Dabei zeigten die Fälle 2 und 8 unauffällige Schwangerschaftsverläufe, bei der Patientin 11 trat während der Schwangerschaft eine Gestose und zusätzlich eine schwere Rh-Inkompatibilität auf.

Die Abb. 21 zeigt, daß die Cortisolkonzentrationen nach Anwendung einer Äthanol-Fällung mit einer Schwankungsbreite von etwa drei Wochen um die 35. SSW stark ansteigen. Während die Anfangskonzentrationen vor dem Anstieg bei den drei Patientinnen nur um 10 ng/ml schwankten, lagen die Endkonzentrationen bei den Fällen mit einem früheren Anstieg (Nr. 1 und 3) wesentlich höher. Ein entsprechendes Verhalten ließ sich auch bei den Patientinnen 10, 11 und 12 beobachten. Im Vergleich dazu ließ sich diese Tendenz bei den entsprechenden Verläufen nach Anwendung der Dichlormethan-Extraktion nicht nachweisen.

Vor dem deutlichen Anstieg der Cortisolkonzentration waren bei der Äthanol-Fällung drei unterschiedliche Verlaufstypen zu beobachten. Bei den Verläufen 3, 4 und 9 fand sich ein kontinuierlicher Anstieg im Beobachtungszeitraum ohne wesentliche Konzentrationssprünge. Bei den Verläufen 5 bis 8 und 12 fand der Anstieg im Anschluß an einen vorübergehenden Konzentrationsabfall statt. In den Fällen 1, 2 und 10 fanden sich vor dem Anstieg nahezu konstante Cortisolkonzentrationen. Eine Zuordnung dieser Befunde zu Auffälligkeiten im Schwangerschaftsverlauf ließ sich nicht vornehmen. Die eben genannten Beobachtungen ließen sich weniger deutlich auch bei den entsprechenden Verläufen nach Anwendung einer Dichlormethan-Extraktion machen.

Zusammengefaßt läßt sich bei einem Vergleich beider Methoden folgendes sagen: Die mit Hilfe der Äthanol-Fällung bestimmten Verlaufswerte liegen im Vergleich zur anderen Methode in den meisten Fällen in einem höheren Konzentrationsbereich. Dabei

treten bei der Äthanol-Fällung innerhalb der Verläufe stärkere Konzentrationsschwankungen auf und der Anstieg verläuft vergleichsweise steiler. Insgesamt fanden jedoch die Schwankungen bei beiden Methoden parallel statt. Nur in einem Fall war bei der Äthanol-Fällung ein zeitlich früherer Konzentrationsanstieg zu beobachten. Bei beiden Methoden fällt es bei den hier dargestellten Verläufen schwer, abweichende Konzentrationswerte und auffällige Schwangerschaftsverläufe miteinander in Beziehung zu bringen.

An dieser Stelle sei eine Besprechung von auffälligen Schwangerschaften angeschlossen, bei denen in den meisten Fällen ein abweichender Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser nachweisbar war. Diese Verläufe sind in der Abb. 30 (Äthanol-Fällung) und Abb. 32 (Dichlormethan-Extraktion) eingezeichnet. Einschränkend ist zu erwähnen, daß sich bei unseren Untersuchungen aufgrund des geringen Stichprobenumfangs keine allgemeingültigen Normalbereiche mit zugehörigen 2s-Bereichen aufstellen ließen.

Bei den Patientinnen 1 - 3 ließen sich in der 27. - 29. SSW ungewöhnlich hohe Hormonkonzentrationen mit beiden Trennmethoden nachweisen. Bei den Patientinnen 1 und 2 war ein intrauteriner Fruchttod bei schwerer Rh-Inkompatibilität nachweisbar. Bei der Patientin 1 wurde die Fruchtwasserprobe drei Tage vor und bei Patientin 2 drei Tage nach dem vermutlichen Absterben des Feten entnommen. Im Fall der Patientin Nr. 3 waren multiple Mißbildungen beim Kind sowie ein Ramifikationsarrest der Plazenta nachweisbar. Die eben genannten Daten stützen die Annahme, daß der Fet auf die beschriebenen Komplikationen mit einer erhöhten Sekretion von Cortisol reagiert, welches anschließend im Fruchtwasser nachzuweisen ist. Diese Reaktion stellt somit ein Beispiel dafür dar, daß der Fet bereits vor der Geburt auf Stressfaktoren in einer sinnvollen Weise reagiert. Dabei ist es bei der Art der genannten Komplikationen unwahrscheinlich, daß die erhöhten Cortisolkonzentrationen durch mütterlichen Einfluß entstehen.

Bei der Patientin 4 lag der Gesamtverlauf bei der Äthanol-Fällung im unteren Normbereich, während mit der Dichlormethan-Extraktion

normale Konzentrationswerte gemessen wurden. Bei der Patientin lag außer einer schweren Rh-Inkompatibilität zusätzlich eine Gestose vor. Über die Cortisolkonzentrationen bei dieser Schwangerschaftskomplikation liegen bisher keine Untersuchungen vor, ein möglicher Zusammenhang ist jedoch denkbar. Nach Oakey et al. kommt es in Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Autoren bei der Gestose zu einem Abfall der Aktivität plazentarer Enzymsysteme (31). Da jedoch die sog. fetale Zone der NNR, wie in der Einleitung beschrieben, bei der Cortisolsynthese auf plazentares Progesteron angewiesen ist, läßt sich die erniedrigte Cortisolkonzentration möglicherweise auf diese Art erklären. Eine andere Möglichkeit zur Deutung der genannten Beobachtung besteht darin, daß im Falle einer Gestose beim Feten eine erniedrigte Östrogenkonzentration vorgefunden wird (31). Da der Stoffwechsel der Östrogene in vielen Punkten mit dem Cortisolstoffwechsel verknüpft ist (31), ließe sich auch hier ein Zusammenhang denken. Weiterhin wird möglicherweise unter den obengenannten Bedingungen beim Feten vermehrt 6ß-Hydroxycortisol ausgeschieden, welches im Radioimmuntest nicht erfaßt wird. Die eben genannten Überlegungen sind jedoch nur hypothetischer Natur, zu Überprüfung sind weitere Untersuchungen notwendig.

Bei der Patientin 10 waren trotz vorliegenden Hydramnions bei beiden Methoden keine auffälligen Konzentrationswerte zu beobachten. Dagegen lag bei einer anderen Patientin (Nr. 6) mit einem Hydramnion die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser nach Äthanol-Fällung knapp oberhalb des Normbereichs. Die Anwendung der Dichlormethan-Extraktion führte in diesem Fall zu einer unauffälligen Cortisolkonzentration. Eine Deutung dieser Befunde erscheint schwierig, da im Falle eines Hydramnions eher eine erniedrigte Cortisolkonzentration im Fruchtwasser zu erwarten ist.

Bei den Patientinnen 5 und 7 war in der 27. bzw. 32. SSW eine Celestan^{R}-Injektion durchgeführt worden. Bei der Patientin 5 lagen die Cortisolkonzentrationen nach Anwendung beider Methoden im Normbereich. Dagegen wurde bei der Patientin 7 mit beiden Methoden eine erhöhte Cortisolkonzentration gemessen.

Bei dieser Patientin lag eine schwere Rh-Inkompatibilität vor und das Neugeborene wies eine starke hämolytische Anämie auf. In beiden Fällen lagen etwa sieben Wochen zwischen dem Zeitpunkt der Injektion und der Amniozentese. Demnach ist bei einer einmaligen Gabe von Celestan in diesem Zeitabstand keine Suppression der fetalen Glucocorticoidproduktion mehr nachzuweisen, vorausgesetzt, daß die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser ein Maßstab für die fetale Glucocorticoidproduktion darstellt.

Bei der Patientin 9 wurden mit beiden Methoden auffallend niedrige Konzentrationswerte gemessen. Im Vergleich zu den Patientinnen 1, 2 und 7 war in diesem Fall eine abgeschwächt verlaufende Rh-Inkompatibilität zu beobachten, das Neugeborene wies nur eine geringgradige hämolytische Anämie auf und erholte sich rasch. Bei einer Rh-Inkompatibilität werden in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung fetale Bilirubinoide ins Fruchtwasser abgegeben. Die spektrophotometrische Bestimmung dieser Bilirubinoide ist heute die Methode der Wahl zur Diagnostizierung und Beurteilung dieses sog. Morbus haemolyticus fetalis. Möglicherweise läßt sich durch eine Bestimmung der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser eine zusätzliche Aussage darüber machen, ob die genannte Erkrankung bereits zu einer ernsthaften Gefährdung des fetalen Organismus geführt hat. Die genannten Versuchsergebnisse lassen den Schluß zu, daß es in diesen Fällen zu einer fetalen Abwehrreaktion in Form einer gesteigerten Sekretion von Nebennierenrindenhormonen kommt. In diesem Zusammenhang war bei der Pat. 8 nach Anwendung beider Methoden ein unauffälliger Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser nachzuweisen, obwohl beim Neugeborenen eine schwere hämolytische Anämie vorlag. Im Gegensatz zu den obengenannten Fällen wurde allerdings bei dieser Patientin die Amniozentese in einem größeren zeitlichen Abstand zur Geburt durchgeführt, so daß es in diesem Fall noch nicht zu einer fetalen Abwehrreaktion gekommen war. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß es bei dieser Erkrankung erst zu einem späten Zeitpunkt zu einer gesteigerten Aktivierung der fetalen NNR kommt.

Die eben angeführten Befunde zeigen, daß sich in vielen Fällen mit nachweisbaren Schwangerschaftskomplikationen auch auffällige Verläufe der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser finden ließen. Bei anderen Patientinnen ergaben sich jedoch trotz nachweisbarer Schwangerschaftskomplikationen keine pathologischen Konzentrationen. Wie eben gezeigt, ließen sich jedoch auch bei Patientinnen mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf scheinbar auffällige Konzentrationsverläufe finden. Dabei konnten allerdings bei unseren Untersuchungen keine verbindlichen Normbereiche festgelegt werden.

Zusammengefaßt lassen die bisherigen Ergebnisse den Schluß zu, daß eventuell noch andere als die dargestellten Faktoren die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser beeinflussen, die bisher noch nicht genügend erkannt sind. Aderjan et al. kamen bei ihren Untersuchungen zu ähnlichen Schlußfolgerungen (10). Im folgenden Abschnitt wird ein Versuch zur Deutung dieser Ergebnisse unternommen. Dabei wird zunächst auf die unterschiedlichen Ergebnisse nach Anwendung der beiden Trennmethoden eingegangen.

Zunächst ist grundsätzlich die Möglichkeit zu diskutieren, daß mit den genannten Trennmethoden zwei verschiedene Hormone gemessen werden. Da jedoch im Anschluß an beide Methoden ein Radioimmuntest durchgeführt wird und das hierbei verwandte Antiserum eine ausreichend hohe Spezifität besitzt (vgl. S.64), erscheint eine solche Möglichkeit unwahrscheinlich. Zusätzlich spricht gegen diese Vermutung, daß bei beiden Methoden in den meisten Fällen parallele Konzentrationsänderungen zu beobachten sind. Aus den eben genannten Gründen erscheint auch eine zweite denkbare Erklärung unwahrscheinlich, daß bei der Äthanol-Fällung aufgrund einer geringeren Spezifität dieser Trennmethode zusätzlich zum Cortisol ein anderes Hormon erfaßt wird. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, daß bei der Äthanol-Fällung zusätzlich zum Cortisol auch Abbauprodukte dieses Hormons mit einer ähnlichen chemischen Struktur erfaßt werden. Auf diese Möglichkeit soll zunächst anhand von Literaturangaben näher eingegangen werden. Anschließend werden die weiteren Untersuchungen erläutert, die in Zusammenhang mit dieser Fragestellung vorgenommen wurden.

Verschiedene Autoren kamen bei ihren Untersuchungen über die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser zu folgenden Aussagen: Nach Tan et al., Aderjan et al., Murphy et al. und Fencl et al. werden mit der Dichlormethan-Extraktion nur die freien, unkonjugierten Steroide erfaßt (4, 6, 7, 10), während bei der Äthanol-Fällung zusätzlich zumindest ein Teil der Konjugate miterfaßt werden (6, 9, 10). Dabei wurde in den genannten Untersuchungen keine Aussage über die chemische Struktur dieser Konjugate gemacht. In diesem Zusammenhang folgerten mehrere Autoren aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse, daß Cortisol und seine Abbauprodukte im Fruchtwasser hauptsächlich vom Feten stammen und über die fetale Niere ausgeschieden werden (4, 6, 8, 9, 24, 25, 57). Schweitzer et al. (24, 25) bestimmten die Konzentrationen einiger Steroide und ihrer Konjugate im Fruchtwasser und berichteten über folgendes Verteilungsmuster: Der wichtigste Metabolit war das Tetrahydrocortisonglucuronid mit einer Konzentration von 123 ng/ml. Danach folgten die Sulfate von Cortisol (31 ng/ml), Cortison (30 ng/ml) und Corticosteron (48 ng/ml), wobei die Konzentration von Cortisolsulfat anders als im mütterlichen Plasma mehr als doppelt so hoch war wie die des Cortisols (24, 25). Nach den eben genannten Autoren trifft dieses Konzentrationsverhältnis auch auf den Neugeborenenurin zu (24, 25, 57). Weiterhin berichteten einige Autoren, daß sich nach Dichlormethan-Extraktion nur ein Teil der Cortisolmetaboliten im Neugeborenenurin finden ließ und daß einige hochpolare Steroide wie das 6ß-Hydroxycortisol und andere am C_{20}-Atom hydroxylierte Metaboliten sowie die Sulfatester nicht erfasst wurden (10, 24, 59). Giroud et al. und Ducharme et al. fanden bei der Analyse von Neugeborenenurin neben dem Tetrahydrocortisonglucuronid als dem Hauptbestandteil, Cortisol und Corticosteron hauptsächlich als Sulfatester vor (58, 59). Auf die erhöhte Konzentration von 6ß-Hydroxycortisol im Fruchtwasser wiesen andere Autoren hin. Lambert et al. bestimmten dieses Hormon und fanden eine Konzentration von 40 bis 50 ng/ml (23). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich die ebengenannten Ergebnisse auch auf das Fruchtwasser übertragen lassen.

5.4. Besprechung der Ergebnisse nach Anwendung von fünf Trennmethoden

Zunächst wurden die Kreuzreaktionen des Antikörpers überprüft; dabei ergab sich eine Kreuzreaktion von 100 % für das Cortisolsulfat. Die Kreuzreaktion von 6ß-Hydroxycortisol betrug weniger als 1 %. Damit ist eine nennenswerte Kreuzreaktion der anderen Tetra- bzw. Pentahydroxyderivate ebenfalls unwahrscheinlich.

Weiterhin ist die relativ hohe Kreuzreaktion von Progesteron (9 %) von Interesse, da dieses Hormon im Fruchtwasser in höheren Konzentrationen vorliegt (bis ca. 170 ng/ml). Die Kreuzreaktion von Corticosteron, welches im Fruchtwasser hauptsächlich als Corticosteronsulfat vorliegt (in einer Konzentration von ca. 40 ng/ml), betrug 8 %. Die Kreuzreaktion von 11-Desoxycorticosteron, welches in einer Konzentration von bis zu 18 ng/ml im Fruchtwasser als Corticosteronsulfat vorliegt, betrug 3 %. Eine Beeinflussung unseres Analysesystems durch die eben aufgeführten Steroide ist also mit Ausnahme von Progesteron recht unwahrscheinlich.

Dieses Progesteron wird bei der Säulenchromatografie nicht zusammen mit Cortisol eluiert. Da die mit Hilfe der Dichlormethan-Extraktion gemessenen Werte in der gleichen Größenordnung wie bei der Säulenchromatografie lagen, erscheint auch hier eine Beeinflussung der Werte durch Progesteron unwahrscheinlich. Es bliebe die Möglichkeit, daß bei der Äthanol-Fällung ein Teil des vorhandenen Progesterons erfaßt wird. Da jedoch die mit dieser Methode gemessenen Cortisolkonzentrationen relativ hoch sind, dürfte der Einfluß des Progesterons bei der genannten Kreuzreaktion gering sein.

Die im folgenden Abschnitt beschriebene Bestimmung von Cortisol und einigen Metaboliten beruhte auf der Kombination einer Säulenchromatografie, einer enzymatischen Hydrolyse und verschiedenen Extraktionsmethoden in unterschiedlicher Zusammenstellung. Dabei wird unseres Wissens erstmals eine größere Studie über den zeitlichen Verlauf der Cortisolsulfatkonzentration im Fruchtwasser

vorgelegt. Die durchgeführte Säulenchromatografie mit anschließendem Radioimmuntest wurde als spezifische Methode zur Bestimmung des freien unkonjugierten Cortisols angesehen. In vergleichbarem Umfang wurde mit der Dichlormethan-Extraktion unkonjugiertes Cortisol erfaßt, wie schon in der obengenannten Literatur angegeben. Die Äthanol-Fällung erfaßte laut Literaturangaben das freie Cortisol sowie einen Teil der Konjugate. Die enzymatische Hydrolyse mit anschließender Dichlormethan-Extraktion dürfte nach den dargelegten Überlegungen zusätzlich zur alleinigen Dichlormethan-Extraktion kreuzreagierende Steroide in der Sulfat- und Glucuronidfraktion erfassen, da mit einem Enzymgemisch aus Glucuronidasen und Sulfatasen gearbeitet wurde. Zur Überprüfung von sonst unkontrollierbaren Einflüssen wurde allerdings zusätzlich nach der enzymatischen Hydrolyse noch eine Säulenchromatografie angeschlossen.

Aderjan et al. fanden nach enzymatischer Spaltung mit Glucuronidase in einem vergleichbaren Testansatz nur unwesentlich höhere Konzentrationen als bei alleiniger Dichlormethan-Extraktion, während die Hormonkonzentration nach Spaltung mit Sulfatase mit den Hormonkonzentrationen nach Äthanol-Fällung vergleichbar waren (10). Gleichzeitig kommen die Glucuronide im Fruchtwasser laut vorstehenden Bemerkungen im wesentlichen nur als Tetrahydroderivate vor. Außerdem sind eine Elution mit dem Cortisol bei der Säulenchromatografie und eine Reaktion mit dem Antikörper unwahrscheinlich. Es wurde gefolgert, daß die Spaltung mit Glucuronidase im Vergleich zur Sulfatase auch in unseren Bestimmungen nur unwesentlich zur Erhöhung der Hormonkonzentration beiträgt, wie schon von Aderjan festgestellt, und daß somit auch bei unseren Bestimmungen der Glucuronidanteil kaum ins Gewicht fällt. Eine solche Schlußfolgerung bedarf jedoch noch einer weiteren Überprüfung. Die wesentlichen Ergebnisse unserer Versuche sind in der Tab. 20 aufgeführt. Eine grafische Darstellung dieser Befunde ist in den Abb. 34 - 38 enthalten, wobei jeweils die Mittelwerte und die zugehörigen 1s-Bereiche dargestellt sind.

Die ersten beiden Spalten der Tab. 20 bzw. Abb. 34 und 35 enthalten eine vergleichende Darstellung der Konzentrationswerte nach Dichlormethan-Extraktion bzw. nach Säulenchromatografie. Es ist zu erkennen, daß die Werte nach Dichlormethan-Extraktion gleichbleibend etwa um 15 ng/ml höher liegen. Die Deutung dieses Befunds allein aus den hier angegebenen Verfahren ist schwierig; möglicherweise werden mit der Dichlormethan-Methode im Unterschied zur Säulenchromatografie zusätzlich einige kreuzreagierende Steroide bzw. ihre Konjugate erfaßt. Die Resultate der Tab. 20 können allerdings erst ab der 33. Schwangerschaftswoche berücksichtigt werden, da in den ersten beiden Gruppen nur wenige Beobachtungen vorlagen.

Der Vergleich der Säulenchromatografie mit der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie (Tab. 20 und Abb. 34 und 36) zeigt, daß die Konzentrationen nach zusätzlicher Hydrolyse im Mittel 2.4 mal so hoch lagen. Dabei wird durch die zusätzliche enzymatische Hydrolyse nach den genannten Voraussetzungen hauptsächlich das Cortisolsulfat erfaßt. Diese Befunde decken sich mit den Befunden von Schweitzer et al., die einen Faktor von 2 (Cortisolsulfat/Cortisol) ermitteln (24). Dieser Faktor verringert sich allerdings, wenn man als Grundlage für die Berechnungen die Dichlormethan-Extraktion mit der Hydrolyse/Säulenchromatografie vergleicht. Er vergrößert sich, wenn man die Hydrolyse mit der Dichlormethan-Extraktion vergleicht. Bei allen drei Möglichkeiten ist jedoch auffällig, daß die Differenz zwischen der Konzentration des freien Cortisols und der totalen Hormonkonzentration während der Schwangerschaft größer wurde, was möglicherweise durch eine vermehrte Ausscheidung von Konjugaten bedingt ist. Dieser Befund konnte schon bei dem Vergleich der Dichlormethan-Extraktion mit der Äthanol-Fällung erhoben werden. Die eben genannte Differenz ist möglicherweise zurückzuführen auf eine wachsende Fähigkeit des fetalen Stoffwechsels, sich im Verlauf der Spätschwangerschaft vermehrt in den Glucocorticoidstoffwechsel einzuschalten und Cortisolmetaboliten zu bilden.

Bei einem Vergleich zwischen der Äthanol-Fällung und der Hydrolyse/Säulenchromatografie (Tab. 20 und Abb. 36 und 37) fällt auf, daß die Cortisolkonzentrationen nach Äthanol-Fällung höher liegen. Möglicherweise erfaßt die Äthanol-Fällung im Vergleich zur anderen Methode zusätzlich einige kreuzreagierende Steroide. Weiterhin enthält der Urin Hemmstoffe für die Enzympräparation aus Glucuronidase und Arylsulfatase (83), die möglicherweise auch im Fruchtwasser enthalten sind. Diesen Angaben entsprechend schienen unsere enzymatischen Spaltungen nicht ganz vollständig zu sein, gemessen an der Hydrolyse von Cortisolsulfat. Aus diesen Befunden ließ sich eine mögliche Differenz erklären. Auf eine ausführliche Bestimmung der Enzymkinetik wurde dabei verzichtet. Weiterhin lag zur Kontrolle der Wiederfindung nur Cortisol und nicht Cortisolsulfat vor, so daß mögliche Verluste während der Bestimmung nicht sicher erfaßt wurden.

Bei dem Vergleich zwischen der Äthanol-Fällung und der Dichlormethan-Extraktion (Tab. 20 und Abb. 35 und 37) ergibt sich ein ähnlicher Faktor von 2.5 wie bei dem Verhältnis zwischen den Hormonkonzentrationen, die nach ausschließlicher Säulenchromatografie und nach enzymatischer Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie gemessen wurden. Möglicherweise ist die von der Äthanol-Fällung erfaßte Konzentration ein Maß für den Anteil des Cortisolsulfats und das Verhältnis dieser Konzentration zu dem nach Dichlormethan-Extraktion gemessenen Wert ein Maßstab für die fetale Aktivität innerhalb des Glucocorticoidstoffwechsels. Bei einem Vergleich der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Dichlormethan-Extraktion (Tab. 20 und Abb. 38) mit den anderen Trennmethoden lieferte diese Methode die höchsten Ergebnisse, welche mit Ausnahme der letzten Gruppe noch um ca. 30 ng/ml höher liegen als die mit der Äthanol-Fällung gemessenen Werte. Als mögliche Ursache kann die schon beschriebene geringere Spezifität der Dichlormethan-Extraktion im Vergleich zur Säulenchromatografie angeführt werden.

5.5. Folgerungen für den fetalen Cortisolstoffwechsel

Nach den vorliegenden Befunden stellt sich die Frage nach der Bedeutung des Cortisolsulfates im fetalen Glucocorticoidstoffwechsel. Nach den Überlegungen von Giroud et al. (58) stellt dieses Hormon kein Anfangsprodukt des fetalen Cortisolstoffwechsels dar, da bei einer Doppel-Tracer-Studie nachgewiesen werden konnte, daß beim Neugeborenen nur ein verschwindend geringer Anteil von radioaktiv markiertem Cortisolsulfat als freies Cortisol oder als Glucuronid ausgeschieden wurde, der größte Teil jedoch unverändert in der Sulfatfraktion nachzuweisen war. Umgekehrt wurde nur ein geringer Teil von markiertem Cortisol als Sulfat oder als Glucuronid ausgeschieden, ein großer Teil entging der Bestimmung. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen folgerten die obengenannten Autoren, daß das Cortisolsulfat eher ein Endprodukt oder ein Nebenprodukt des fetalen Stoffwechsels darstellt. Möglicherweise wird beim Feten die Konzentration des freien, biologisch aktiven Cortisols teilweise durch die Bildung des biologisch inaktiven Sulfatesters reguliert, der anschließend über die Niere ausgeschieden wird. Ähnlich wie beim Cortisol wird der fetale Organismus im Falle des 11-Desoxycorticosteron durch die Bildung des Sulfatesters vor einer zu hohen Konzentration dieses Mineralcorticoids geschützt. Entsprechende Sulfotransferasen ließen sich in der Leber und der Nebenniere von Feten nachweisen. In diesem Zusammenhang schlossen eine Reihe von Autoren aufgrund ihrer Untersuchungen die Möglichkeit aus, daß das Cortisolsulfat im mütterlichen Organismus entsteht (24, 25, 58). Gegen diese Möglichkeit spricht weiterhin die Beobachtung, daß das Neugeborene auch einige Zeit nach der Geburt noch größere Mengen an Cortisolsulfat ausscheidet (58, 59). Einschränkend ist zu den ebengenannten Ergebnissen von Giroud et al. zu sagen, daß die Untersuchungen bei Neugeborenen durchgeführt wurden und somit nicht unbedingt die Vorgänge im fetalen Stoffwechsel erfaßt wurden.

Während nach den genannten Überlegungen die physiologische Bedeutung des Cortisolsulfats noch weitgehend ungeklärt ist, kann jedoch in Übereinstimmung mit einer Reihe von Autoren die

Konzentration dieses Metaboliten im Fruchtwasser als ein Maßstab für die fetale Aktivität im Glucocorticoidstoffwechsel betrachtet werden (24, 25, 58, 89). In diesem Zusammenhang wird im folgenden nochmals auf unsere Ergebnisse eingegangen.

Zunächst wurde untersucht, ob sich bei allen Trennmethoden ein signifikanter Anstieg der Cortisolkonzentration im Zeitraum zwischen der 30. - 41. SSW nachweisen ließ. Zu diesem Zweck wurde dieser Zeitraum in vier Zeitabschnitte unterteilt. Anschließend wurde bei allen fünf Methoden eine einfache Varianzanalyse durchgeführt, die Ergebnisse sind in den Tabellen 21 bis 25 dargestellt. Die praktische Durchführung dieser Methode und die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurde bereits näher erläutert (vgl. S. 93) Im Rahmen dieser Untersuchungen ließ sich bei allen fünf Trennmethoden ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen mindestens zwei Zeitabschnitten nachweisen. Dabei lag im Falle der Säulenchromatografie die berechnete Prüfgröße nur knapp über dem kritischen Tabellenwert. Bei der Äthanol-Fällung und der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie ergaben sich bei der Berechnung der Prüfgrößen die höchsten Werte. Weiterhin wurde bei den einzelnen Trennmethoden untersucht, ab welchem der vier Zeitabschnitte ein signifikanter Konzentrationsanstieg nachzuweisen war. Das angewandte Testverfahren wurde bereits näher erläutert (vgl. S. 94), die Ergebnisse sind in den Tabellen 26 bis 30 jeweils in der letzten Spalte dargestellt. Dabei ließ sich außer bei der Säulenchromatografie bei allen anderen Methoden ein signifikanter Konzentrationsanstieg in der 39. - 41. SSW nachweisen. Auf den fehlenden Nachweis eines signifikanten Konzentrationsanstiegs bei der Säulenchromatografie wurde bereits an anderer Stelle eingegangen (vgl. S.109), als Ursachen sind unter anderem methodische und statistische Gründe (geringer Stichprobenumfang, Meßfehler) zu nennen. Wie die Abb. 34 zeigt, kann auch bei der Säulenchromatografie ein Anstieg der Cortisolkonzentration in der 39. bis 41. SSW angenommen werden, zur Überprüfung sollte jedoch noch eine größere Untersuchungsreihe durchgeführt werden.

In den Abbildungen 39 bis 41 sind anhand von Punktediagrammen die Beziehungen zwischen den einzelnen Trennmethoden dargestellt. Weiterhin sind in jedem Diagramm die berechneten Regressionsgeraden eingezeichnet; die zugehörigen Regressionsgleichungen sind jeweils in der Abbildungslegende aufgeführt. Die Streuungen der Punktwolken bei den einzelnen Abbildungen zeigen bereits, daß zwischen den einzelnen Methoden ein unterschiedlich starker Zusammenhang besteht. Zur genauen Darstellung der Beziehungen wurden alle Konzentrationswerte logarithmisch transformiert und eine Korrelationstabelle aufgestellt. Die Tab. 31 zeigt die Korrelationskoeffizienten zwischen den fünf Trennmethoden mit den zugehörigen 95%-Vertrauensbereichen. Wie die Tabelle zeigt, besteht zwischen der Äthanol-Fällung und der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie die höchste Korrelation (0.95), gefolgt von der Korrelation zwischen der Äthanol-Fällung und der Hydrolyse (0.94) und weiter gefolgt von der Korrelation zwischen der Dichlormethan-Extraktion und der Säulenchromatografie (0.88). Eine niedrigere Korrelation bestand zwischen der Säulenchromatografie und der Äthanol-Fällung (0.64), zwischen der Dichlormethan-Extraktion und der Äthanol-Fällung (0.7) und zwischen der Säulenchromatografie und der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie (0.66). Alle Korrelationskoeffizienten waren jedoch bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant von Null verschieden.

Die genannten Korrelationskoeffizienten stützen die Überlegung, daß die Äthanol-Fällung und die enzymatische Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie vergleichbare Hormonfraktionen erfassen. Dasselbe trifft auf die Dichlormethan-Extraktion und die Säulenchromatografie zu. Bei der Anwendung von Korrelationsverfahren zur Prüfung von Zusammenhängen sind jedoch auch gewisse Einschränkungen zu beachten (90). Die enzymatische Hydrolyse ohne ein anschließendes spezifisches Trennverfahren wurde bei unseren Überlegungen nicht weiter berücksichtigt. Zwar ergaben sich auch bei diesem Verfahren in einigen Fällen hohe Korrelationskoeffizienten, durch das Fehlen einer spezifischen Trennmethode sind jedoch die erfaßten Hormonfraktionen nicht genau festzulegen.

Es erhebt sich die Frage nach der Bedeutung der eben dargestellten Befunde für normale sowie für auffällige Schwangerschaften. Aderjan stellte in Übereinstimmung mit unseren Befunden fest, daß die nach Durchführung einer Äthanol-Fällung gefundenen Cortisol-Konzentrationen während der Schwangerschaft deutlicher ansteigen als bei der Dichlormethan-Extraktion. Wie oben gezeigt, bestand eine gute Korrelation zwischen den Hormonkonzentrationen, die von der Äthanol-Fällung und von der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie erfaßt wurden. Dabei erfaßt die zuletzt genannte Methode zusätzlich zum freien unkonjugierten Cortisol zu einem großen Teil Cortisolsulfat bzw. möglicherweise auch noch andere Konjugate. Die Konzentration der Konjugate spiegelt jedoch nach den schon genannten Untersuchungen wahrscheinlich die Aktivität des fetalen Glucocorticoidstoffwechsels wider (24, 25). Dabei ist allerdings noch keine Aussage darüber möglich, ob diese Konjugate und speziell das Cortisolsulfat Abbauprodukte des von der fetalen NNR sezernierten Cortisols sind oder ob sie zum Teil das vom Fet metabolisierte mütterliche Cortisol widerspiegeln. Nach anderen, schon erwähnten Untersuchungen wird jedoch das von der Mutter stammende Cortisol beim Überschreiten der Plazenta zum größten Teil zu Cortison ungewandelt, wobei die fetale Lunge dieses Cortison wieder zu Cortisol umwandeln kann. Nach Giroud et al. (58) stellt diese plazentare Umwandlung einen möglichen Schutzmechanismus vor der Aktivität der mütterlichen Glucocorticoide im fetalen Stoffwechsel dar. Das Cortison wird zu einem großen Teil im Anschluß an die Plazentapassage von der fetalen Leber zu Tetrahydrocortisonglucuronid abgebaut, welches im Fruchtwasser in hohen Konzentrationen gefunden wurde und somit wahrscheinlich einen besseren Parameter für den Einfluß des mütterlichen Glucocorticoidstoffwechsels darstellt.

In einer Untersuchung über die konjugierten Glucocorticoide im Fruchtwasser fand Murphy unter anderem heraus (89), daß diese Konjugate besser mit der Lungenreife des Feten korrelieren ($r = 0.79$) als das unkonjugierte Cortisol ($r = 0.58$). Dieses Ergebnis ist nach dem genannten Autor darauf zurückzuführen, daß

die konjugierten Glucocorticoide wahrscheinlich zum größten Teil aus dem fetalen Stoffwechsel stammen, während das unkonjugierte Cortisol teilweise auch vom Chorion abgegeben wird. In Übereinstimmung mit diesen Vermutungen ergab sich bei der Untersuchung von anencephalen Feten, daß die Konzentrationen der konjugierten Glucocorticoide im Fruchtwasser hier sehr niedrig waren, während die Konzentration des unkonjugierten Cortisols nahezu im Normbereich lag (89). Murphy folgert in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, daß die Konzentration dieser Konjugate im Fruchtwasser (speziell die Sulfatkonzentration) einen brauchbaren Parameter zur Beurteilung der fetalen Reife stellt (89) Wie bereits ausführlich besprochen, werden mit Hilfe der Äthanol-Fällung diese konjugierten Glucocorticoide zu einem großen Teil erfaßt, während mit der Dichlormethan-Extraktion hauptsächlich das unkonjugierte Cortisol gemessen wird. Dabei ließ sich bei unseren schon ausführlich dargestellten Verläufen nach gleichzeitiger Bestimmung der Konzentrationen beider Hormonfraktionen in den vorliegenden Fruchtwasserproben feststellen, daß die resultierenden Verlaufskurven in vielen Fällen parallel verliefen und daß im Falle von Schwangerschaftskomplikationen auch nach der Bestimmung des unkonjugierten Hormonanteils bei einigen Verläufen ein auffälliger Konzentrationsverlauf nachweisbar war. Diese Beobachtungen stehen in einem gewissen Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Autoren (57), die aufgrund ihrer Untersuchungen annahmen, daß das konjugierte und das unkonjugierte Cortisol im Fruchtwasser aus unterschiedlichen Quellen stammen.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, daß auch das unkonjugierte Cortisol im Fruchtwasser mit der fetalen Reife in Zusammenhang steht. Vermutlich ist die vergleichsweise engere Beziehung zwischen der Konzentration des konjugierten Cortisols und der fetalen Reife darauf zurückzuführen, daß diese Konjugate nicht nur einen Parameter für die Produktionsrate der fetalen Nebenniere darstellen,wie es möglicherweise beim unkonjugierten Cortisol der Fall ist, sondern daß sie den Funktionszustand aller Organsysteme widerspiegeln, die an der Synthese und am Abbau der Glucocorticoide beteiligt sind. In diesem Zusammenhang

soll darauf hingewiesen werden, daß das Cortisol im fetalen Organismus eine große Bedeutung für die Organreifung, die Induktion von Enzymsystemen und möglicherweise auch für die Anregung der Geburtsvorgänge besitzt; eine Zusammenfassung der genannten Wirkungen findet sich bei Liggins (66). Dabei ist nach den bisher durchgeführten Untersuchungen zu vermuten, daß die fetale Hypophysen-Nebennierenrindenachse zumindest in der Spätschwangerschaft eine weitgehende Autonomie besitzt. In diesem Zusammenhang wurde tierexperimentell bereits mehrfach nachgewiesen, daß die fetale Nebennierenrinde nach Gabe von ACTH mit einer gesteigerten Cortisolsynthese antwortet (49, 91, 92). Dabei ist es aufgrund der vorliegenden Untersuchungen unwahrscheinlich, daß mütterliches ACTH in physiologischen Konzentrationen die Plazenta überschreitet (31). Weiterhin wurde beobachtet, daß sich die ACTH-Konzentration im fetalen Plasma durch eine Cortisolinfusion senken läßt (93). Arai et al. fanden unter anderem heraus (35), daß sich auch beim menschlichen Feten eine eigenständige ACTH-Sekretion nachweisen läßt. In diesem Zusammenhang bestimmen Fencl et al. die Plasmakonzentration von Cortisol bei anencephalen Feten (38), dabei stellten sie eine erniedrigte Konzentration dieses Hormons fest. Weiterhin wurde bereits mehrfach darauf hingewiesen, daß das mütterliche Cortisol bei der Plazentapassage zu einem großen Teil in Cortison umgewandelt wird, womit eine Suppression der fetalen ACTH-Sekretion verhindert wird. Zusammenfassend verdeutlichen die genannten Untersuchungen die Existenz einer autonomen Regelung der Cortisolsekretion beim Feten. Zusätzlich scheinen allerdings auch Schutzmechanismen zu existieren, die bei einer fehlenden fetalen Glucocorticoidproduktion (beispielsweise bei einer Nebennierenagenesie) wirksam werden. So wurde bereits auf die Fähigkeit der fetalen Lungenzellen hingewiesen, zirkulierendes Cortison in Cortisol umzuwandeln. Weiterhin ist unter bestimmten Umständen ein direkter Übertritt von mütterlichem Cortisol über die Plazenta möglich (31). In diesem Zusammenhang wies Liggins darauf hin (66), daß das Cortisol weniger für die anfängliche Entwicklung und die Differenzierung der fetalen Organe notwendig ist, sondern vielmehr die abschließende Entwicklung

lebenswichtiger Organsysteme und die zeitliche Abstimmung der Umstellungsvorgänge im fetalen Organismus vor der Geburt einleitet. Möglicherweise stehen diese Folgerungen mit unserer Beobachtung in Zusammenhang, daß die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser erst in der 35. bis 36. SSW signifikant ansteigt.

Bei unseren Untersuchungen ließ sich ein nochmaliger Anstieg der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in der 39. bis 41. SSW nachweisen. In diesem Zusammenhang wurde von verschiedenen Autoren diskutiert, ob dieser im gesamten fetalen Kreislauf nachweisbare Konzentrationsanstieg in einem Zusammenhang mit der Geburt steht (2, 10-42 , 44-48). Dabei erhebt sich die Frage, ob sich dieser Anstieg der Cortisolkonzentration auf eine erhöhte Sekretionsrate der fetalen Nebennierenrinde zurückführen läßt oder ob unter dem Einfluß der Geburt vermehrt mütterliche Glucocorticoide in den fetalen Kreislauf gelangen. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob der genannte Konzentrationsanstieg der Geburt vorausgeht oder ob er eine Folge der Geburt ist. In diesem Zusammenhang wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen das Verhalten der Cortisolkonzentration im mütterlichen Blut und im Nabelschnurblut einerseits bei Spontanentbindungen und andererseits bei medikamentös eingeleiteten Geburten und bei abdominellen Schnittentbindungen untersucht. Ohrlander et al. (42) fanden bei ihren Untersuchungen nach Geburtsbeginn eine signifikante Korrelation zwischen den Cortisolkonzentrationen im mütterlichen und im fetalen Blut unabhängig von der Art der Entbindung. Eine solche Korrelation bestand nach den genannten Autoren vor dem Beginn der Geburt nicht. Gleichzeitig ließen sich bei Geburtsbeginn im fetalen Kreislauf keine wesentlich unterschiedlichen Cortisolkonzentrationen zwischen den verschiedenen Entbindungsformen nachweisen. Die Autoren folgerten aufgrund ihrer Ergebnisse, daß der mehrfach beobachtete Anstieg der Cortisolkonzentration im Nabelschnurblut eher eine Folge der Geburt ist und daß er somit nicht für die Einleitung der Geburt verantwortlich ist. Zwei weitere Arbeitsgruppen kamen aufgrund vergleichbarer Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen (2, 41). Dagegen folgerten Murphy et al. und

Leong et al. aus ihren Untersuchungsergebnissen, daß sich bereits vor der Geburt ein Anstieg der fetalen Cortisolproduktion nachweisen läßt und daß dieser Konzentrationsanstieg somit möglicherweise die Geburt einleitet (44, 45). Wie bereits angegeben, ließ sich auch bei unseren Untersuchungen ein frühzeitiger Anstieg der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser nachweisen. Dabei ließ sich nicht klären, ob es sich hierbei um einen primären Konzentrationsanstieg handelt oder ob er sekundär durch bisher unbekannte Ursachen hervorgerufen wird. So ist es beispielsweise denkbar, daß eine gesteigerte Wehentätigkeit in der Spätschwangerschaft einen Anlaß für eine vermehrte Sekretion von Glucocorticoiden durch die fetale Nebennierenrinde darstellt. Dabei sei darauf hingewiesen, daß auch andere Meßgrößen im Fruchtwasser etwa ab der 30. SSW ansteigen, die teilweise mit der fetalen Lungenreifung zusammenhängen. So steigt von der 32. SSW an der Lecithin-Sphingomyelin-Quotient stark an und ab der 36. SSW ist eine Aktivitätszunahme der Cholin-Phosphotransferase nachzuweisen, wobei die Bildung dieses für die Lecithinsynthese wichtigen Enzyms durch Cortisol induziert wird. Gleichzeitig ist nach der 37. SSW bei sonst gesunden Neugeborenen ein Atemnotsyndrom zunehmend seltener zu beobachten. Aus den genannten Gründen lag es nahe, die Cortisolkonzentration und den Lecithin-Sphingomyelin-Quotienten im Fruchtwasser in Beziehung zu setzen. Bei einem Vergleich der vorliegenden Untersuchungen fällt auf, daß die errechneten Korrelationskoeffizienten stark variieren, unabhängig ob das freie Cortisol (7, 11) oder das Gesamtcortisol einschließlich der konjugierten Anteile gemessen wurde (6, 9). Es ist zu überprüfen, ob das Cortisolsulfat im Fruchtwasser einen genaueren Parameter für den fetalen Glucocorticoidstoffwechsel darstellt und ob seine Konzentration gleichzeitig besser mit dem Lecithin-Sphingomyelin-Quotienten korreliert. Vermutlich lassen sich durch diese Untersuchungen weitere Einblicke in den Schwangerschaftsablauf gewinnen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde der zeitliche Verlauf der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Patientinnen mit einer komplikationslosen Schwangerschaft sowie bei Patientinnen mit einer gestörten Schwangerschaft bestimmt. Bei der praktischen Durchführung der Versuche wurden die vorliegenden Fruchtwasserproben zunächst parallel einer Äthanol-Fällung und einer Dichlormethan-Extraktion unterworfen und anschließend ein Radioimmuntest zur Bestimmung der Cortisolkonzentration durchgeführt.

Die Abb. 21 - 28. zeigen die zeitlichen Verläufe der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von zwölf Patientinnen nach paralleler Durchführung der beiden Trennmethoden. In den Tab. 12 und 13 sind die mittleren Cortisolkonzentrationen im Fruchtwasser für verschiedene Zeitabschnitte im Zeitraum von der 27. - 41. Schwangerschaftswoche dargestellt. Dabei zeigten die Verlaufskurven nach Anwendung einer Äthanol-Fällung in jedem der zwölf Fälle einen deutlichen Konzentrationsanstieg, während bei der Dichlormethan-Extraktion nur in sechs Fällen ein Konzentrationsanstieg zu beobachten war. Gleichzeitig lagen die mit Hilfe der Äthanol-Fällung bestimmten Verlaufswerte in einem höheren Konzentrationsbereich. Dabei traten bei der Äthanol-Fällung innerhalb der Verlaufskurven stärkere Konzentrationsschwankungen auf und der Konzentrationsanstieg verlief vergleichsweise steiler als bei der anderen Methode. Insgesamt jedoch fanden die Schwankungen bei beiden Methoden parallel statt mit einem deutlichen Anstieg der Cortisolkonzentration in der 35. - 36. Schwangerschaftswoche. Nur in einem Fall war bei der Äthanol-Fällung ein zeitlich früherer Konzentrationsanstieg zu beobachten.

Insgesamt bestätigte sich bei unserer Untersuchung die in der bisherigen Literatur beschriebene Beobachtung, daß sich bei parallel durchgeführter Äthanol-Fällung und Dichlormethan-Extraktion unterschiedliche Cortisolkonzentrationen in den Fruchtwasserproben ergaben.

Die Untersuchung der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser von Patientinnen, bei denen sich im Verlauf der Schwangerschaft Komplikationen einstellten, ergab folgendes (Abb. 30 und 32): Bei drei Patientinnen ließen sich mit beiden Trennmethoden in der 27. - 29. SSW ungewöhnlich hohe Hormonkonzentrationen im Fruchtwasser nachweisen. Dabei trat bei zwei Patientinnen ein intrauteriner Fruchttod bei schwerer Rh-Inkompatibilität mit einem Hydrops universalis auf, bei der dritten Patientin waren multiple Mißbildungen beim Kind sowie ein Ramifikationsarrest der Plazenta nachweisbar. Die genannten Beobachtungen stützen die Schlußfolgerung, daß der Fet auf die beschriebenen Komplikationen mit einer erhöhten Sekretion von Cortisol reagiert, welches anschließend im Fruchtwasser nachzuweisen ist. Diese Reaktion stellt somit ein Beispiel dafür dar, daß der Fet bereits vor der Geburt auf Stressfaktoren in einer sinnvollen Weise reagiert.

In anderen Fällen war zu beobachten, daß bei einer Rh-Inkompatibilität mit einer hämolytischen Anämie des Feten erst zu einem späten Zeitpunkt der Erkrankung eine erhöhte Cortisolkonzentration im Fruchtwasser nachweisbar ist. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß es bei der genannten Erkrankung erst dann zu einer gesteigerten Aktivierung der fetalen Nebennierenrinde kommt, wenn eine ernsthafte Gefährdung des fetalen Organismus vorliegt. Die spektrophotometrische Bestimmung der Bilirubinoide im Fruchtwasser ist die Methode der Wahl zur Beurteilung der hämolytischen Anämie des Feten bei einer Rh-Inkompatibilität. Unsere Untersuchungsergebnisse unterstreichen die diagnostische Bedeutung einer zusätzlichen Bestimmung der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser.

Bei zwei weiteren Patientinnen war in der 27. bzw. 32 SSW eine Celestan^{R}-Injektion zur Prophylaxe des Atemnotsyndroms des Neugeborenen durchgeführt worden. In einem Zeitabstand von mehreren Wochen wurde die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser bestimmt, dabei ergab sich eine normale Hormonkonzentration. Demnach war bei diesen Patientinnen nach einer einmaligen Gabe

von Celestan^{R} keine langfristige Suppression der fetalen Glucocorticoidproduktion nachzuweisen.

Zusammengefaßt ergaben sich bei einer größeren Anzahl von Patientinnen mit nachweisbaren Schwangerschaftskomplikationen auch auffällige Verläufe der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser, bei anderen Patientinnen waren jedoch trotz aufgetretener Komplikationen keine abweichenden Konzentrationsverläufe nachzuweisen. Umgekehrt ließen sich jedoch auch bei Patientinnen mit einem unauffälligen Schwangerschaftsverlauf scheinbar auffällige Cortisolkonzentrationen finden. Die bisherigen Ergebnisse lassen somit den Schluß zu, daß noch andere als die bisher bekannten Faktoren die Cortisolkonzentration im Fruchtwasser beeinflussen.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Untersuchung wurde der Versuch unternommen, die bereits beschriebene Konzentrationsdifferenz nach der Bestimmung der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser mit Hilfe der Äthanol-Fällung und der Dichlormethan-Extraktion auf die Existenz von Cortisolmetaboliten zurückzuführen, die von beiden Methoden in unterschiedlichem Ausmaß erfaßt werden. Bei der praktischen Durchführung der Versuche wurden unterschiedliche Extraktionsverfahren, eine enzymatische Hydrolyse und eine Säulenchromatografie in verschiedenen Kombinationen angewendet, so daß sich insgesamt fünf Analysewege ergaben (vgl. Abb. 4).

Zunächst wurden die genannten Analysemethoden in einer größeren Versuchsreihe bezüglich ihrer Aussagekraft und ihrer Genauigkeit miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang wurden außerdem die Kreuzreaktionen einiger wichtiger Steroide im Radioimmuntest bestimmt (vgl. Tab. 1), auffallend war eine Kreuzreaktion von annähernd 100 % im Falle des Cortisol-Sulfats. Die Kreuzreaktion eines weiteren polaren Cortisolmetaboliten (6 ß-Hydroxycortisol) betrug weniger als 1 %.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wurde davon ausgegangen, daß die Säulenchromatografie mit anschließendem Radioimmuntest eine spezifische Methode zur Bestimmung des freien, unkonjugierten Cortisols darstellt. Weiterhin wurde vorausgesetzt, daß nach einer zusätzlichen enzymatischen Hydrolyse vor der Säulenchromatografie mit einem Enzymgemisch aus einer Glucuronidase und einer Sulfatase ein großer Teil der Cortisolmetaboliten in der Glucuronid- und Sulfatfraktion miterfaßt werden. Dabei wurde aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse und der vorliegenden Literaturangaben gefolgert, daß der Anteil an Cortisolglucuronid keine größere Bedeutung für unsere Untersuchungen besitzt. Da sich zwischen der enzymatischen Hydrolyse mit anschließender Säulenchromatografie einerseits und der Äthanol-Fällung andererseits eine hohe Korrelation ergab und die Konzentrationswerte in einer vergleichbaren Größenordnung lagen, wurde angenommen, daß auch nach Anwendung einer Äthanol-Fällung die konjugierten Cortisolmetaboliten größtenteils miterfaßt werden. Bei einem Vergleich der Dichlormethan-Extraktion mit der Säulenchromatografie ergab sich die Schlußfolgerung, daß nach Anwendung beider Trennmethoden das freie, unkonjugierte Cortisol im Fruchtwasser erfaßt wird. Die Abb. 34. - 38. enthalten die wesentlichen Versuchsergebnisse für alle fünf Analysemethoden in grafischer Form.

Da im Fruchtwasser nach den bisher vorliegenden Untersuchungen ein ähnliches Ausscheidungsmuster für die konjugierten Cortisolmetaboliten nachweisbar ist wie im Urin von Neugeborenen, läßt sich in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen folgern, daß diese Metaboliten hauptsächlich vom Feten stammen und über die fetale Niere ausgeschieden werden. Damit spiegelt die Konzentration der Cortisolmetaboliten im Fruchtwasser vermutlich den Funktionszustand des fetalen Glucocorticoidstoffwechsels wider. Da nach unseren Untersuchungen die Konzentrationsdifferenz zwischen dem unkonjugierten Cortisol und den Cortisolmetaboliten im Verlauf der Schwangerschaft ansteigt, läßt sich aus dieser Beobachtung auf eine zunehmende Reifung und Aktivierung der am

Cortisolstoffwechsel beteiligten Organsysteme und Regelkreise im fetalen Organismus schließen. In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen ließ sich auch bei unseren Bestimmungen ein deutlicher Anstieg der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser in der 35. - 36. Schwangerschaftswoche nachweisen. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, ob dieser Konzentrationsanstieg in einem Zusammenhang mit der Geburt steht. Dabei wurde genauer auf die Frage eingegangen, ob sich der Anstieg der Cortisolkonzentration im Fruchtwasser auf eine erhöhte Sekretionsrate der fetalen Nebennierenrinde zurückführen läßt oder ob unter dem Einfluß der Geburt vermehrt mütterliche Glucocorticoide in den fetalen Kreislauf gelangen. Gleichzeitig wurde erörtert, ob der genannte Konzentrationsanstieg der Geburt vorausgeht und somit möglicherweise einen physiologischen Mechanismus zur Geburtseinleitung darstellt oder ob er eher eine Folge der Umstellungsvorgänge im Rahmen der einsetzenden Geburt ist.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Untersuchung wurde auf die besondere Bedeutung des Cortisolsulfats im fetalen Organismus eingegangen. In diesem Zusammenhang wurde auf eine Arbeit von Murphy verwiesen (89). Sie fand unter anderem heraus, daß die konjugierten Cortisolmetaboliten im Fruchtwasser und speziell das Cortisolsulfat besser mit der Lungenreife des Feten korrelieren als das unkonjugierte Cortisol. In Übereinstimmung mit unseren Überlegungen ist dieses Ergebnis darauf zurückzuführen, daß die konjugierten Cortisolmetaboliten hauptsächlich aus dem fetalen Stoffwechsel stammen, während das unkonjugierte Cortisol auch auf anderen Wegen in das Fruchtwasser gelangt. Dabei ließen unsere Ergebnisse vermuten, daß auch das unkonjugierte Cortisol im Fruchtwasser mit der fetalen Reife in Zusammenhang steht. Vermutlich ist die vergleichsweise engere Beziehung zwischen der Konzentration der konjugierten Cortisolmetaboliten und der fetalen Reife darauf zurückzuführen, daß diese Konjugate nicht nur einen Parameter für die Sekretionsrate der fetalen Glucucorticoide darstellen, wie es möglicherweise beim unkonjugierten Cortisol der Fall ist, sondern daß sie den Funktionszustand aller

Organsysteme widerspiegeln, die an der Synthese und am Abbau der Glucocorticoide beteiligt sind.

7. Literaturverzeichnis

1. BAIRD, C.W., BUSH, I.E.
Cortisol and cortisone content of amniotic fluid from diabetic and non-diabetic women.
Acta endocrinol. (Kbh.) 34, 97 -104 (1960)

2. POKOLY, T.B.
The role of cortisol in human parturition.
Am. J. Obstet. Gynecol. 117, 549-553 (1973)

3. SYBULSKI, S., MAUGHAN, G.B.
A rapid method for the measurement of estradiol and hydrocortisone levels in maternal and fetal blood and amniotic fluid.
Am. J. Obstet. Gynecol. 121, 32-40 (1975)

4. MURPHY, B.E.P., PATRICK, J., DENTON, R.L.
Cortisol in amniotic fluid during human gestation.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 164-167 (1975)

5. MURPHY, B.E.P.
Cortisol and cortisone levels in the cord blood at delivery of infants with and without the respiratory distress syndrome.
Am. J. Obstet. Gynecol. 119, 1112-1120 (1974)

6. FENCL, M., TULCHINSKY, D.
Total cortisol in amniotic fluid and fetal lung maturation.
N. Engl. J. Med. 292, 133-136 (1975)

7. TAN, S.Y., GEWOLB, I.H., HOBBINS, J.C.
Unconjugated cortisol in human amniotic fluid: Relationship to lecithin/sphingomyelin ratio.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 412-418 (1976)

8. SMITH, B.T., WORTHINGTON, D., PIERCY, W.N.
The relationship of cortisol and cortisone to saturated lecithin concentration in ovine amniotic fluid and fetal lung liquid.
Endocrinology. 101, 104-109 (1977)

9. SIVAKUMARAN, T., DUNCAN, M.L., EFFER, S.B., YOUNGLAI, E.V.
Relationship between cortisol and lecithin/sphingomyelin ratios in human amniotic fluid.
Am. J. Obstet. Gynecol. 122, 291-294 (1975)

10. ADERJAN, R., LORENZ, U., RAUH, W., VECSEI, P., ROTTGERS, H.
Determination of cortisol, tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone,corticosterone, and aldosterone in human amniotic fluid.
Short communication at the Satellite Symposium-Vth International Congress of Endocrinology "Hormonal Control in Fetal Development", Paris 1976

11. JOHNSON, B., HENSLEIGH, P.A.
Surfactant tests and amniotic fluid cortisol.
Am. J. Obstet. Gynecol. 129, 105-107 (1977)

12. ZUSPAN, F.P., CORDERO, L., SEMCHYSHYN, S.
Effects of hydrocortisone on lecithin-sphingomyelin ratio.
Am. J. Obstet. Gynecol. 128, 571-574 (1977)

13. GIANNOPOULOS, G.
Uptake and metabolism of cortisone and cortisol by the fetal rabbit lung.
Steroids. 23, 845-853 (1974)

14. TORDAY, J.S., SMITH, T.B., GIROUD, C.J.P.
The rabbit fetal lung as a glucocorticoid target tissue.
Endocrinology. 96, 1462-1467 (1975)

15. SMITH, T.B., TORDAY, J.S., GIROUD, C.J.P.
The growth promoting effect of cortisol on human fetal lung cells.
Steroids. 22, 515-524 (1973)

16. RUDER, H.J., GUY, R.L., LIPSETT, M.B.
A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 219-224 (1972)

17. VECSEI, P.
Radioimmunological determination of plasma cortisol.
Experientia. 28, 1104-1105 (1972)

18. FOSTER, L.B., DUNN, R.T.
Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma.
Clin. Chem. 20/3, 365-368 (1974)

19. FAHMY, D., READ, G.F., HILLIER, S.G.
Some observations on the determination of cortisol in human plasma by radioimmunoassay using antisera against cortisol-3-BSA.
Steroids. 26/3, 267-280 (1975)

20. DASH, R.J., ENGLAND, B.G., MIDGLEY, A.R., NISWENDER, G.D.
A specific, non-chromatographic radioimmunoassay for human plasma cortisol.
Steroids. 26, 647-661 (1975)

21. COLBURN, W.A.
Radioimmunoassay for cortisol using antibodies against prednisolone conjugated at the 3-position.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 868-875 (1975)

22. KLOPPER, A.
Steroids in amniotic fluid.
Annals of Clinical Research 2, 289-299 (1970)

23. LAMBERT, M., PENNINGTON, G.W.
The estimation of polar steroids in liquor amnii.
J. Endocrinol. 32, 287-293 (1965)

24. SCHWEITZER, M., GIROUD, C.J.P.
A comparison of the pattern of steroid glucuronides and sulfates in maternal plasma, umbilical cord plasma and amniotic fluid. II
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 793-798 (1971)

25. SCHWEITZER, M., KLEIN, G.P., GIROUD, C.J.P.
Characterization of 17-deoxy- and 17-hydroxycorticosteroids in human liquor amnii.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 605-611 (1971)

26. LIGGINS, G.C., HOWIE, R.N.
A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress snydrome in premature infants.
Pediatrics. 50, 615-625 (1972)

27. SIEBERT, W., MEITINGER, C.
Prophylaxe des Atemnotsyndroms mit Betamethason.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 35, 130-133 (1975)

28. SCHWENZEL, W., JUNG, H.
Pränatale Behandlungsmethoden zur Vermeidung eines Atemnotsyndroms bei frühgeborenen Kindern.
Gynäkologe. 8, 198-205 (1975)

29. SIEGENTHALER, W., WERNING, C.
Stoffwechsel und Nachweis von Cortisol.
In: Klinische Pathophysiologie, pp 320-323, hrsg. von W. Siegenthaler, George Thieme Verlag, Stuttgart 1973

30. PETERSON, R.E.
Cortisol.
In: Endocrinology of Pregnancy, pp 155-166, hrsg. von F. Fuchs und A. Klopper, Harper & Row, New York, Evanston and London 1971

31. OAKEY, R.E.
The pregressive increase in estrogen production in human pregnancy: An appraisal of the factors responsible.
Vitamins & Hormones 28, 1-36 (1970)

32. BRIEN, T.G., DALRYMPLE, I.J.
A longitudinal study of the free cortisol index in pregnancy.
Brit. J. Obstet. Gynecol. 83, 361-367 (1976)

33. GOODYER, C.G., HALL, C.St.G., BRANCHAUD, C., GIROUD, C.J.P.
Exploration of the human fetal pituitary adrenal axis: stimulation of cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate biosynthesis by homologous pituitary in organ culture.
Steroids. 29, 407-416 (1977)

34. TUIMALA, R., KAUPPILA, A., RÖNNEBERG, L., JOUPPILA, R., HAAPALAHTI, J.
The effect of labour on ACTH and cortisol levels in amniotic fluid and maternal blood.
Brit. J. Obstet. Gynecol. 83, 707-710 (1976)

35. ARAI, K., YANAIHARA, T., OKINAGA, S.
Adrenocorticotropic hormone in human fetal blood at delivery.
Am. J. Obstet. Gynecol. 125, 1136-1140 (1976)

36. JOHNSTONE, F., CAMPBELL, S.
Unbound plasma cortisol response to adrenal stimulation in pregnancy.
J. Endocrinol. 64, 185-186 (1975)

37. LEFEBVRE, Y., MARIER, R., AMYOT, G., BILODEAU, R., HOTTE, R., RAYNAULT, P., DUROCHER, J.G., LANTHIER, A.
Maternal, fetal, and intra-amniotic hormonal and biologic changes resulting from a single dose of hydrocortisone injected in the intra-amniotic compartment.
Am. J. Obstet. Gynecol. 125/5, 609-612 (1976)

38. FENCL, M., OSATHANONDH, R., TULCHINSKY, D.
Plasma cortisol and cortisone in pregnancies with normal and anencephalic fetuses.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 80-85 (1976)

39. MIYAKAWA, I., IKEDA, I., NAKAYAMA, M., MAEYAMA, M.
Plasma concentrations of cortisol, progesterone and unconjugated oestradiol and oestriol in women with live anencephalic foetuses before, during, and after labour.
J. Endocrinol. 69, 291-292 (1976)

40. SYBULSKI, S., GOLDSMITH, W.J., MAUGHAN, G.B.
Cortisol levels in fetal scalp, maternal, and umbical cord plasma.
Obstet. Gynecol. 46/3, 268-271 (1975)

41. SYBULSKI, S., MAUGHAN, G.B.
Cortisol levels in umbilical cord plasma in relation to labour and delivery.
Am. J. Obstet. Gynecol. 125/2, 236-238 (1976)

42. OHRLANDER, S., GENNSER, G., ENEROTH, P.
Plasma cortisol levels in human fetus during parturition.
Obstet. Gynecol. 48, 381-387 (1976)

43. NWOSU, U.C., WALLACH, E.E., FELDMAN, J.D., BONGIOVANNI, A.M.
Parturition-induced changes in maternal plasma cortisol levels.
Obstet. Gynecol. 46, 263-267 (1975)

44. LEONG, M.K., MURPHY, B.E.P.
Cortisol levels in maternal venous and umbilical cord arterial and venous serum at vaginal delivery.
Am. J. Obstet. Gynecol. 124, 471-473 (1976)

45. MURPHY, B.E.P.
Does the human fetal adrenal play a role in parturition?
Am. J. Obstet. Gynecol. 115, 521-525 (1973)

46. JOLIVET, A., BLANCHIER, H., GAUTRAY, J.P.
Blood cortisol variations during late pregnancy and labor.
Am. J. Obstet. Gynecol. 119, 775-783 (1974)

47. TALBERT, L.M., PEARLMAN, W.H., POTTER, H.D.
Maternal and fetal serum levels of total cortisol and cortisone, unbound cortisol, and corticosteroid-binding globulin in vaginal delivery and cesarean section.
Am. J. Obstet. Gynecol. 129, 781-787 (1977)

48. ARAI, K., YANAIHARA, T.
Steroid hormone changes in fetal blood during labor.
Am. J. Obstet. Gynecol. 127, 879-883 (1977)

49. JAFFE, R.B., SERON-FERRE, M., PARER, J.T., LAWRENCE, C.C.
The primate fetal pituitary-adrenal axis in the perinatal period.
Am. J. Obstet. Gynecol. 131, 164-170 (1978)

50. BEITINS, I.Z., BAYARD, F., ANCES, I.G., et al
The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term.
Pediatr. Res. 7, 509-519 (1973)

51. TERVILÄ, L., TERAMO, K., RAJAMÄKI, A.
Some aspects of the transfer of cortisol from maternal to foetal blood during normal labour.
Ann. Chir. Gynaecol. Fenn. 58, 264-266 (1969)

52. MURPHY, B.E.P., CLARK, S.J., DONALD, I.R., PINSKY, M., VEDADY, D.
Conversion of maternal cortisol to cortisone during placental transfer to the human fetus.
Am. J. Obstet. Gynecol. 118, 538-541 (1974)

53. KITTINGER, G.W.
Feto-maternal production and transfer of cortisol in the rhesus.
Steroids 23, 229-243 (1974)

54. SCHWEITZER, M., BRANCHAUD, C., GIROUD, C.J.P.
Maternal and umbilical cord plasma concentrations of steroids of the pregn-4-ene c-21-yl sulfate series at term.
Steroids 14, 519-532 (1969)

55. MURPHY, B.E.P.
Steroid arteriovenous difference in umbilical cord plasma: evidence of cortisol production by the human fetus in early gestation.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 1037-1038 (1973)

56. BRANCHAUD, C., SCHWEITZER, M., GIROUD, C.J.P.
Characterization of the 21-yl sulfates of 11 ß, 17α, 21-trihydroxypregn - 4-ene-3, 20-dione;
17α, 21-dihydroxypregn-4-ene-3, 11, 20-trione;
11ß, 21-dihydroxypregn-4-ene-3, 20-dione;
21-hydroxypregn-4-ene-3, 11, 20-trione and 21-hydroxypregn - 4-ene-3, 20-dione in human cord plasma.
Steroids 14, 179-190 (1969)

57. ABRAMOVICH, D.R., WADE, A.P.,
Transplacental passage of steroids: The presence of corticosteroids in amniotic fluid.
J. Obstet. Gynecol. Brit. Cwlth. 76, 610-614 (1969)

58. GIROUD, C.J.P.
Aspects of corticosteroid biogenesis and metabolism during the perinatal period.
Clin. Obstet. Gynecol. 14/3, 745-762 (1971)

59. DUCHARME, J.R., LEBOEUF, G., SANDOR, T.
C_{21} Steroid metabolism and conjugation in the human premature neonate. I. Urinary excretion and the response to ACTH.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 96-101 (1970)

60. SCHINDLER, A.E., WUCHTER, J., HOPPEN, H.O. SIEKMANN, L.
Steroids in urine of the newborn human.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 334-339 (1974)

61. KLEIN, G.P., BADEN, M., GIROUD, S.J.P.
Quantitative measurement and significance of five plasma corticosteroids during the perinatal period.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 944-950 (1973)

62. DERKS, H.J.G.M., DRAYER, N.M.
Polar corticosteroids in human neonatal urine; synthesis and gas chromatography-mass spectrometry of ring A reduced G-hydroxylated corticosteroids.
Steroids 31/1, 9-22 (1978)

63. DAWOOD, M.Y.
Hormones in amniotic fluid.
Am. J. Obstet. Gynecol. 128, 576-583 (1977)

64. SMITH, I.D., SHEARMAN, R.P.
The relationship of human umbilical arterial and venous plasma levels of corticosteroids to gestational age.
J. Endocrinol. 55, 211-212 (1972)

65. SLAVINSKI, E.A., JULL, J.W., AUERSPERG, N.
Steroidogenic pathways and trophic response to adrenocorticotrophin of cultured adrenocortical cells in different states of differentiation.
J. Endocrinol. 69, 385-394 (1976)

66. LIGGINS, G.C.
Adrenocortical-related maturational events in the fetus.
Am. J. Obstet. Gynecol. 126, 931-941 (1976)

67. VILLEE, C.A.
Placenta and fetal tissues: A biphasic system for the synthesis of steroids.
Am. J. Obstet. Gynecol. 104, 406-415 (1969)

68. ASSALI, N.S.
Adrenal cortex.
In: Pathophysiology of gestation, pp 129-132, hrsg. von N.S. Assali, Academic Press, New York - London 1972

69. REEVES, B.D., CALHOUN, D.W.
Reliability criteria for saturation analysis of steroids by competitive protein binding.
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 2nd Symposium: Steroid Assay by Protein Binding, Geneva 1970

70. EKINS, R., NEWMAN, B.
Theoretical aspects of saturation analysis.
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 2nd Symposium: Steroid Assay by Protein Binding, Geneva 1970

71. ABRAHAM, G.E.
Radioimmunoassay of steroids in biological materials.
Acta endocrinol. (Kbh.) Suppl. 183, 1-42 (1974)

72. MIDGLEY, A.R., NISWENDER, G.D., REBAR, R.W.
Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specifity).
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 1st Symposium: Immunoassay of Gonadotrophine, Geneva 1969

73. BÖTTNER, H.
Statistische Qualitätskontrolle in der Klinischen Chemie.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 5, 41-96 (1967)

74. SACHS, L.
Die Zuverlässigkeit von Laboratoriumsmethoden.
In: Angewandte Statistik, pp 159-161, hrsg. von L. Sachs, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

75. RODBARD, D., RAYFORD, P.L., COOPER, J.A., ROSS, G.T.
Statistical quality control of radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. 28, 1412-1418 (1968)

76. RODBARD, D., LEWALD, J.E.
Computer analysis of radioligand assay and radioimmunoassay data.
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 2nd Symposium: Steroid Assay by Protein Binding, Geneva 1970

77. SACHS, L.
Bemerkungen zum Krankengut einer Klinik.
In: Angewandte Statistik, pp 165-166, hrsg. von L. Sachs, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

78. VOGT, W., POPP, B., KNEDEL, M.
Ein modular aufgebautes Computerprogramm zur Ergebniswertberechnung von Radioimmunoassays und Proteinbindungstests.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 438-445 (1973)

79. RODBARD, D., BRIDSON, W., RAYFORD, P.L.
Rapid calculation of radioimmunoassay results.
J. Lab. Clin. Med. 74, 770-781 (1969)

80. WEAVER, C.K., CARGILLE, C.M.
Radioimmunoassay : A simplified procedure for dose interpolation.
J. Lab. Clin. Med. 77, 661-664 (1971)

81. SACHS, L.
Voraussetzungen der Regressionsanalyse.
In: Angewandte Statistik, p. 338, hrsg. von
L. Sachs, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

82. BRAND, S.
Meßfehler und Normalverteilung.
In: Datenanalyse mit statistischen Methoden und Computerprogrammen, pp 82-84, hrsg. von
S. Brandt, Bibliographisches Institut, Mannheim / Wien / Zürich 1975

83. GRAEF, V., FUCHS, M.
Untersuchungen zur vollständigen enzymatischen Hydrolyse von Steroidkonjugaten im Harn.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 163-167 (1975)

84. GENNSER, G., OHRLANDER, S., ENEROTH, P.
Cortisol in amniotic fluid and cord blood in relation to prenatal betamethasone load and delivery.
Am. J. Obstet. Gynecol. 124, 43-50 (1976)

85. SIEGENTHALER, W., WERNING, C.
Biosynthese der Nebennierenrindenhormone.
In: Klinische Pathophysiologie, pp 316-317, hrsg. von W. Siegenthalter, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973

86. NIE, N.H., HULL, C.H., JENKINS, J.G.
SPSS, ein Statistik-Programmsystem für die Sozialwissenschaften.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York 1976

87. SACHS, L.
Die logarithmische Normalverteilung.
In: Angewandte Statistik, pp 86-89, hrsg. von L. Sachs, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

88. SACHS, L.
Varianzanalytische Methoden.
In: Angewandte Statistik, pp 381-426, hrsg. von L. Sachs, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

89. MURPHY, B.E.P.
Conjugated corticosteroids in amniotic fluid and fetal lung maturation.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47, 212-215 (1978)

90. SACHS, L.
Typisierung korrelativer Zusammenhänge.
In: Angewandte Statistik, pp 306-308, hrsg. von L. Sachs, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

91. PEPE, G.J., TOWNSLEY, J.D.
The effect of ACTH and HCG on adrenal steroidogenesis in the neonatal baboon.
Acta endocrinol. 88, 132-138 (1978)

92. BROWN, E.H., COGHLAN, J.P., HARDY, K.I., WINTOUR, E.M.
Aldosterone, corticosterone, cortisol, 11-deoxycortisol and 11-doxycorticosterone concentrations in the blood of chronically cannulated ovine foetuses: effect of ACTH
Acta endocrinol. 88, 364-374 (1978)

93. JACK, P.M., MAGGAR, D.M. et al.
Adrenocorticotropin and glucocorticoid concentrations in fetal and maternal plasma of rabbit does continuously infused with cortisol from day 21 to day 24 of gestation.
Am. J. Obstet. Gynecol. 133, 594-597 (1979)

8. Dankvermerk

Herrn Priv. Doz. Dr. med. H. Kaulhausen danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundschaftliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. med. E.J. Plotz, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Bonn, danke ich für die großzügige Unterstützung und Förderung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. L. Siekmann bin ich für wertvolle methodische Hinweise zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt weiterhin Fräulein Karin Pfeiffer für ihre zuverlässige Hilfe bei der Durchführung der Bestimmungen.

9. Lebenslauf

Am 21. November 1952 wurde ich als Sohn von Rudolf Böttger und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Rossbach, in Dresden geboren.

Ostern 1959 wurde ich in die Volksschule in Dresden eingeschult, die ich bis zur zweiten Klasse besuchte. Anfang 1960 siedelte meine Familie nach Mönchengladbach über.

In Mönchengladbach besuchte ich die Volksschule bis zur vierten Klasse und wechselte nach bestandener Aufnahmeprüfung auf das Stiftische Humanistische Gymnasium über. Am 16. Mai 1972 legte ich die Reifeprüfung ab.

Am 15. Oktober 1972 begann ich das Studium der Medizin in Bonn und legte im August 1974 die ärztliche Vorprüfung ab. Im August 1975 folgten der erste Abschnitt der ärztlichen Prüfung und im März 1978 der zweite Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Das in der Ausbildungsordnung vorgeschriebene "Praktische Jahr" legte ich bis zum April 1979 am Kreiskrankenhaus Waldbröl ab.

Im April 1979 bestand ich das Abschlußexamen und am 23. Mai 1979 erhielt ich meine Approbation als Arzt. Seit dem 1. August 1979 bin ich als Assistent in der Abteilung für Innere Medizin am St. Johannes-Hospital Bonn tätig. Vom Januar 1976 bis 1979 war ich als Doktorand in der Universitäts-Frauenklinik Bonn tätig.